

**Charakterisierung und Optimierung eines neuartigen Bakterienstammes
zur Herstellung von Bernsteinsäure**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sarah Bromann

aus Gardelegen

1. Referent: Privatdozent Dr. Ulf Christian Prüße

2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 04.12.2019

mündliche Prüfung (Disputation) am: 11.06.2020

Druckjahr 2020

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Posterbeiträge

Bromann, S., Goy, K., Kuenz, A., Willke, T., Prüße, U.: Biotechnische Herstellung von Bernsteinsäure aus Glycerin. (Poster) ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (2018)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Glycerin.....	3
2.1.1 Gewinnung und Darstellung	3
2.1.2 Eigenschaften	5
2.1.3 Anwendungsmöglichkeiten.....	5
2.1.4 Einsatz von Glycerin als Substrat für die biotechnologische Bernstein- säureproduktion	6
2.2 Bernsteinsäure	7
2.2.1 Eigenschaften	7
2.2.2 Weltmarkt für Bernsteinsäure	8
2.2.3 Gewinnung und Darstellung	9
2.2.4 Stoffwechselwege der Bernsteinsäuresynthese	13
2.3 Actinobacteria-Isolat.....	17
2.4 <i>Paenibacillus lautus</i>	18
2.5 Mikrobiologische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen.....	19
2.5.1 Sauerstoffbedarf.....	19
2.5.2 „most probable number“-Verfahren (MPN-Verfahren).....	20
2.5.3 KOH-Test	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Chemikalien	22
3.2 Verwendete Mikroorganismen	23
3.3 Medien	23
3.3.1 Nährstoff-Medium.....	23
3.3.2 LB-Medium nach Lennox	24
3.3.3 Actinomycete Isolation Agar	24
3.3.4 Standardproduktionsmedium.....	25

3.3.5	LentiKat®-Medium	26
3.3.6	Thioglykolat-Nährmedium.....	27
3.4	Stammhaltung und Kultivierung.....	27
3.4.1	Kryokonservierung	27
3.4.2	Kultivierung in Laborflaschen	28
3.4.3	Probeentnahme, -verarbeitung und -lagerung	29
3.5	Immobilisierung	30
3.5.1	Anzucht in Schüttelkolben	31
3.5.2	Produktion in Laborflaschen	32
3.5.3	Färbung mit Karbolfuchsin.....	32
3.6	Analytische Methoden	32
3.6.1	Optische Dichte.....	32
3.6.2	pH-Wert.....	33
3.6.3	Mikroskopie.....	34
3.6.4	Biotrockenmasse.....	34
3.6.5	High performance liquid chromatography	35
3.6.6	EZ:faast™ Aminosäurebestimmung und Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor	36
3.7	Datenauswertung	37
3.7.1	Ertragskoeffizient	37
3.7.2	Produktivität	38
4	Ergebnisse und Diskussion.....	39
4.1	Isolierung des Actinobacteria-Isolats aus der Mischkultur DSM 32268	39
4.1.1	Taxonomische Charakterisierung des Bernsteinsäureproduzenten	41
4.1.2	Darstellung der Mischkultur DSM 32268 im Vergleich zum Stamm <i>Paenibacillus lautus</i> DSM 13411	42
4.1.3	Überprüfung der Fähigkeit zur Verwertung von Milchsäure	46
4.1.4	Kultivierung auf Actinomycete Isolation Agar.....	47
4.1.5	Ermittlung des Sauerstoffbedarfs mittels Thioglykolat-Test	51
4.2	Optimierung des Produktionsprozesses der Mischkultur DSM 32268.....	53

4.2.1	Etablierung einer Zwischenkultur.....	53
4.2.2	Wahl eines geeigneten Kultivierungssystems für die Mischkultur DSM 32268.....	57
4.2.3	Einfluss der Probenahme auf das Wachstum, die Substratverwertung und Produktbildung.....	59
4.2.4	Einfluss der Schüttelfrequenz.....	61
4.2.5	Einfluss des Arbeitsvolumens.....	62
4.2.6	Einfluss der Temperatur.....	65
4.2.7	Einfluss der Inokulationsmenge.....	67
4.2.8	Einfluss des Neutralisationsmittels.....	70
4.2.9	Einfluss des Substrates.....	74
4.3	Entwicklung eines definierten Produktionsmediums.....	90
4.3.1	Variation der einzelnen Medienkomponenten.....	90
4.3.2	Hefeextrakt-Pepton-Kombinatorik.....	92
4.3.3	Einfluss von Aminosäuren auf die Produktbildung.....	94
4.3.4	Einfluss von Vitaminen auf die Produktbildung.....	100
4.4	Immobilisierung der Mischkultur DSM 32268 in LentiKats®.....	102
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	109
	Abbildungsverzeichnis.....	112
	Tabellenverzeichnis.....	119
	Literatur.....	120
	Anhang.....	127

Abkürzungsverzeichnis

\$	Dollar
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µS	MikroSiemens
ADP	Adenosindiphosphat
AIA	Actinomycete Isolation Agar
Ala	Alanin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse in g/L
c	Konzentration in g/L
CaCO ₃	Calciumcarboant
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
CuZnCr	Kupferzinkchromat
CX	Anzahl der Kohlenstoffe
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
DSM	Stammsammlung der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E XXX	Lebensmittelzusatzstoff mit der europäischen Zulassungsnummer
NaCl	Natriumchlorid
FAD/FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
FAME	Fettsäuremethylester, engl. <u>F</u> atty <u>A</u> cid <u>M</u> ethyl <u>E</u> ster
FFA	Freie Fettsäuren, engl. <u>F</u> ree <u>E</u> atty <u>A</u> cids
VI	

g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GDP	Guanosindiphosphat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
HSCoA	Coenzym A
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
ID	Innerer Durchmesser
Ile	Isoleucin
ISP	International Streptomyces Project, zur Charakterisierung von Streptomyces-Arten nach dem International Streptomyces Project
kg	Kilogramm
L	Liter
LB	komplexes Nährmedium, engl. <u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar
Met	Methionin
MgCO ₃	Magnesiumcarbonat
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NA	Nähragar, engl. <u>N</u> utrient <u>A</u> gar

Abkürzungsverzeichnis

NADH/NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NB	Nährbouillon, engl. <u>N</u> utrient <u>B</u> roth
Ni	Nickel
NiO	Nickel(II)-oxid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD _{605nm}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 605 \text{ nm}$
P	Phosphat
P _{ges} bzw. P _{max}	Produktivität (gesamt bzw. maximal) in g/(L·h)
Pd-Al ₂ O ₃	Palladium auf Aluminiumoxid-Katalysator
Pd-CaCO ₃	Palladium auf Calciumcarbonat-Katalysator
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
Ph3	Phase 3 des Phasenkontrastmikroskops
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
RI	Brechungsindex, engl. <u>R</u> efractive <u>I</u> ndex
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
rRNA	ribosomale RNA
SDB	Sicherheitsdatenblatt
Ser	Serin
T	Temperatur
TCA	Tricarbonsäurezyklus, auch Citratzyklus, engl. <u>T</u> ri <u>c</u> arboxylic <u>A</u> cid
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolettstrahlung
Val	Valin
Vol.-%	Volumenprozent

Y	Ertragskoeffizient, engl. Yield in g/g
YE	Hefeextrakt, engl. <u>Y</u> east <u>E</u> xtract

1 Einleitung und Zielsetzung

Während der Bedarf nach fossilen Energien beständig wächst, werden viele Ressourcen, allen voran Erdöl, mehr und mehr erschöpft ¹. Durch das Verbrennen fossiler Energieträger und der großflächigen Entwaldung erfolgt ein enormer Ausstoß von Treibhausgasen in die Atmosphäre ². In den letzten Jahren entwickelte sich daraus eine Debatte um die Nachhaltigkeit und den ökologischen Fußabdruck. Dabei zählen Umwelt- und Klimaschutz zu den wichtigsten Herausforderungen ³. Eine nachhaltige Produktion biobasierter Chemikalien aus erneuerbaren Ressourcen ist somit zum Thema von weltweitem Interesse geworden ⁴. Neue und nachhaltige Produktionswege sind erforderlich, um den chemischen Markt auch fortan bedienen zu können ⁵.

Hervorzuheben ist hier beispielhaft Bernsteinsäure. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu 1,4-Dicarbonsäuren kann Bernsteinsäure potenziell als attraktiver Ersatz für Maleinsäureanhydrid dienen und sich infolgedessen zu einer Plattformchemikalie für die Synthese zahlreicher Verbindungen entwickeln. Für die Industrie sind Plattformchemikalien von besonderer Bedeutung, da sie Produktionsprozesse flexibler gestalten. Neben dem bedeutenden Ausgangsstoff 1,4-Butandiol lassen sich mindestens neun weitere wichtige Grundstoffe aus der C4-Dicarbonsäure ableiten. Hinzu kommen Polyamide und Polyester, für die Bernsteinsäure ebenfalls eine wichtige Basisverbindung darstellt.

Obwohl die Synthese ausgehend von Erdöl bisher kostengünstiger ist, sind die mikrobiellen Reaktionswege spezifischer. Bernsteinsäure, auch als Succinat bekannt, ist ein Zwischenprodukt des Tricarbonsäurezyklus und kann als Fermentationsendprodukt unter anaeroben Bedingungen akkumuliert werden ⁴. Eine deutlich bessere CO₂-Bilanz und ein 30 – 40 % geringerer Energieverbrauch im Vergleich zu herkömmlicher, aus fossilen Rohstoffen gewonnener Bernsteinsäure führte zur Kommerzialisierung biobasierter Bernsteinsäure in den letzten Jahren ⁶. Für die Produktion muss der am besten geeignetste Mikroorganismus ausgewählt werden. Etablierte Kandidaten, um Bernsteinsäure herzustellen, sind *Actinobacillus succinogenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens* oder aber *Escherichia coli*. Vorrangig über Metabolic Engineering werden maßgeschneiderte Produktionsorganismen geschaffen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines wirtschaftlich effizienten Verfahrens zur biotechnischen Produktion von Bernsteinsäure mit einer neuartigen Bakterienkultur. Der am Institut für Agrartechnologie des Thünen-Instituts isolierte Bernsteinsäureproduzent soll auf seine Prozesstauglichkeit überprüft werden. Im Fokus steht dabei die Isolierung des bernsteinsäurebildenden Actinobacteria-Vertreters aus der vorliegenden Mischkultur DSM 32268 und dessen anschließende Charakterisierung hinsichtlich der Nähstoff- und Kultivierungsansprüche.

Einleitung und Zielsetzung

Um eine Kostenreduktion für diesen Prozess zu gewährleisten, wird auf das bei der Biodieselproduktion anfallende Kuppelprodukt Rohglycerin zurückgegriffen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Glycerin

2.1.1 Gewinnung und Darstellung

2.1.1.1 Herstellung von Biodiesel

Die Herstellung von Biodiesel erfolgt vorrangig aus Pflanzenölen. Darüber hinaus werden auch andere Rohstoffe wie Tierfette oder bereits genutzte Pflanzenöle eingesetzt. Die Zusammensetzung des Rohstoffes ist dabei entscheidend für die Wahl des Konversionsverfahrens zur Biodieselherstellung. Als Rohstoff wird in Deutschland überwiegend Raps gehandelt (Abbildung 1). Das gängigste Verfahren ist daher die Umesterung von Pflanzenölen mit Methanol zu Fettsäuremethylestern (FAME) ⁷.

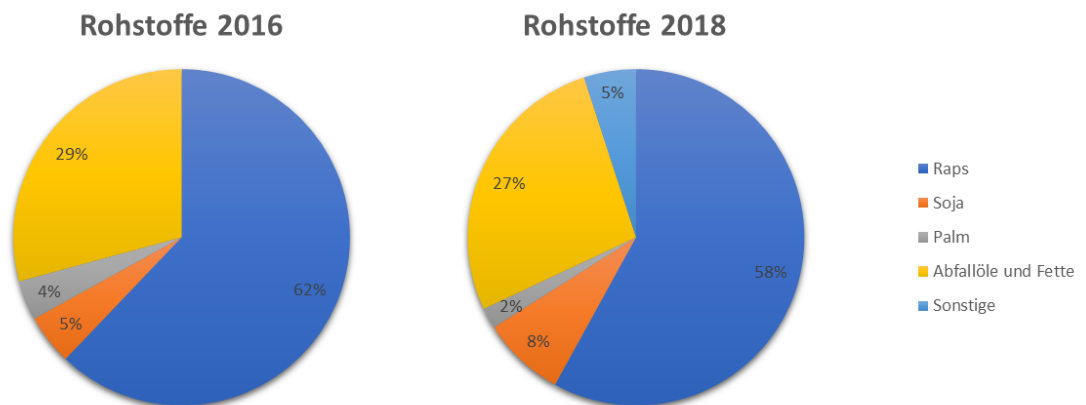
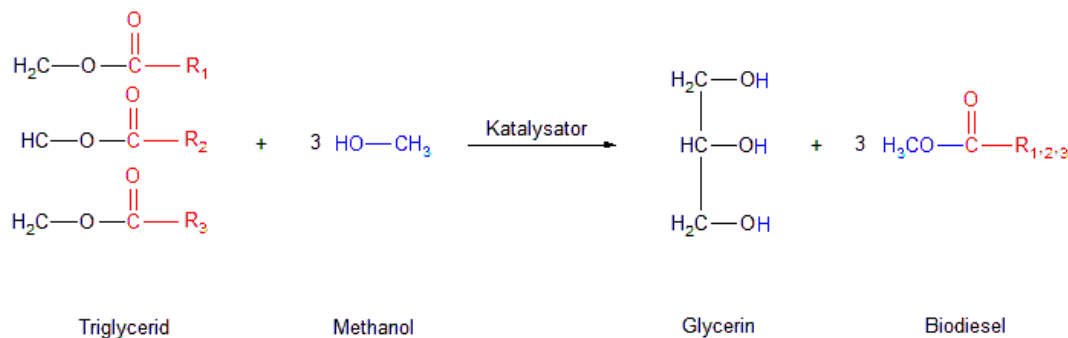


Abbildung 1: Rohstoffe für die Biodieselproduktion in den Jahren 2016 und 2018 in Deutschland ⁸

Das Herstellungsverfahren beginnt mit dem Zermahlen und Pressen der Rapssamen. Mehr als die Hälfte fällt als fester Pressrückstand, dem Rapskuchen, an. Nur etwa 40 % werden als Pflanzenöl gewonnen. Anschließend erfolgt unter Zugabe von Methanol und eines Katalysators, entweder Natrium- oder Kaliumhydroxid, die chemische Reaktion der Umesterung des Triglycerids. Durch Rühren des Gemischs für mehrere Stunden in einem Rührkessel mit Wärmetauscher bei Temperaturen von 50 °C bis 65 °C entstehen Verbindungen aus Fettsäure und Methanol, die als FAME zusammengefasst und als Biodiesel bezeichnet werden. FAME sammeln sich nach dem Abkühlen im Absetztank in der oberen Phase als Roh-Biodiesel an. Als Kuppelprodukt, in der unteren Phase, fallen Glycerin sowie Nebenprodukte an. Jährlich werden bei der Biodieselerzeugung in Deutschland ca. 310000 t Rohglycerin und Glycerinwasser verschiedener Qualitäten hervorgebracht ⁸. Der geringere Anteil wird direkt als Tierfutter, für Biogas oder die Abwasserreinigung verwertet. Zumeist erfolgt die Aufbereitung des Rohglycerins zu Pharmaglycerin, um es für industrielle Zwecke nutzbar zu machen.

Die allgemeine Reaktionsgleichung zur Herstellung von Biodiesel lautet:



2.1.1.2 Glycerinaufbereitung

Es gibt drei Arten von Rohglycerin aus den verschiedenen Fettverarbeitungsprozessen:

- aus der Seifenherstellung
- aus der direkten Fettsplaltung
- als Nebenprodukt bei der Biodiesel-Herstellung

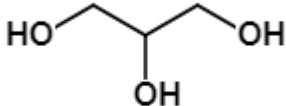
Der technologische Verarbeitungsschritt ist entscheidend für die Art der Aufbereitung und Veredelung der Glycerinphase zu hochwertigem Glycerindestillat. Hinsichtlich der Reinheit findet die Unterteilung in Rohglycerin (15 - 80 %), technisches Glycerin (> 97 %) und Pharmaglycerin (> 99,7 %) statt. Ein Großteil des in der Industrie eingesetzten Pharmaglycerins stammt aus Biodieselwerken. Unmittelbar nach der Umesterung ist das Glycerin mit Wasser, Methanol, freien Fettsäuren und Katalysatorresten verunreinigt⁹, sodass das gewonnene Rohglycerin eine Reinheit von etwa 50 % besitzt. Die Einstufung als gefährlicher Abfall, bedingt durch den hohen Methanolgehalt, verlangt eine weitere Aufbereitung durch die Anlagenbetreiber. Dazu wird das Glycerin mit einer Säure vermischt und die enthaltenen Seifen abgespalten. Durch Rühren des Gemischs und anschließendem Dekantieren entstehen drei Phasen. Die Salze fallen als feste Phase aus. Bei Einsatz von Kaliumhydroxid als Katalysator wird überwiegend Schwefelsäure verwendet, sodass die entstehenden Salze als Düngemittel (K_2SO_4) genutzt werden können. Eine Trennung des Glycerin-Wassergemischs von den freien Fettsäuren ist aufgrund des Dichteunterschieds möglich. Nach dem Dekantieren verbleiben Methanol und Wasser in der Glycerinphase. Durch Trocknung wird das Gemisch eingedampft und von Methanol und Wasser befreit. Das aufbereitete Glycerin erreicht eine Reinheit von etwa 80 % und bietet somit eine Vermarktung als technisches Glycerin. Dieses kann anschließend zu Pharmaglycerin aufgewertet und so für pharmazeutische Zwecke nutzbar gemacht werden. Dazu durchläuft das Glycerin eine Destillationskolonne, in der stufenweise das verbliebene Wasser entzogen wird. Die Entfernung der enthaltenen Begleit- und Geruchsstoffe erfolgt unter hohem Druck und hoher Temperatur mit Hilfe von Dampf. Durch Behandlung mit Aktivkohle

sowie anschließender Filtration und Kühlung entsteht Pharmaglycerin mit einer Reinheit von mindestens 99,7 % ^{7,10,11}.

2.1.2 Eigenschaften

Glycerin ist der Trivialname und die gebräuchliche Bezeichnung für Propan-1,2,3-triol sowie der einfachste dreiwertige Alkohol, ein Triol. Aufgrund seines süßlichen Geschmacks wird Glycerin oft auch als Zuckeralkohol bezeichnet. Bei Raumtemperatur ist Glycerin eine farb- und geruchlose, viskose und hygroskopische Flüssigkeit. Glycerin ist in Form von Fettsäureester (Triglyceride) Bestandteil aller natürlichen Fette und Öle und somit in der Natur weit verbreitet. Als Zwischenprodukt spielt es zudem eine zentrale Rolle in verschiedenen Stoffwechselwegen.

Tabelle 1: Eigenschaften von Glycerin (SDB, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Allgemeines	
Summenformel	C ₃ H ₈ O ₃
Strukturformel	
CAS-Nummer	56-81-5
EG-Nummer	200-289-5
Physikalische und chemische Kenngrößen	
Molare Masse	92,09 g/mol
Löslichkeit	~ 1000 g/L (25 °C, in Wasser)
pH-Wert	6,5 – 8,5 (500 g/L, 20 °C)
Dichte	1,26 g/cm ³ (20 °C)
Schmelzpunkt	18,2 °C
Siedepunkt/Siedebereich	290 °C bei 1013 hPa
Flammpunkt	199 °C
Zersetzungstemperatur	> 290°C

2.1.3 Anwendungsmöglichkeiten

Glycerin ist ein äußerst nützlicher und vielseitig verwendbarer Ausgangsstoff für über 1500 Anwendungen ⁸. Es findet Einsatz als Feuchthaltemittel sowie Weichmacher in Kosmetika, Körperpflegemitteln und Haushaltsprodukten. Bei der Herstellung von beispielsweise Zahnpasta wird Glycerin, mit einem Anteil von 20 – 30 %, benötigt. Zum einen soll es zur Verbesserung des Geschmacks beitragen, zum anderen das Austrocknen verhindern sowie Glanz verleihen.

Auch in Lebensmitteln wird Glycerin als Geschmacksverbesserer und Lebensmittelzusatzstoff unter der Bezeichnung E 422 eingesetzt, aber auch als Konservierungsstoff und Konsistenzverbesserer. Im Bereich der pharmazeutischen Industrie dient Glycerin als Lösemittel, Feuchtigkeitsspende, Feuchthaltemittel und Konsistenzgeber. Weitere Anwendung findet Glycerin zudem als Frostschutzmittel, bei der Papier- und Textilherstellung und bei Schmiermitteln, aber auch bei der Herstellung von Kunststoffen, Mikrochips und Farbstoffen. In der Medizin dient es als Medikament, aufgrund seiner Fähigkeit Wasser zu binden, unter anderem zur Behandlung von Hirnödemen. In der Landwirtschaft findet Glycerin als Futtermittel für Wiederkäuer, Schweine und Hühner Anwendung, einerseits um die Feuchtigkeit zu speichern, andererseits aber auch um die Schmackhaftigkeit zu verbessern.

2.1.4 Einsatz von Glycerin als Substrat für die biotechnologische Bernsteinsäureproduktion

Hinsichtlich der wirtschaftlichen Machbarkeit wird Glycerin als Ausgangsmaterial für die biobasierte Bernsteinsäureherstellung auf Rang 2 der 15 erneuerbaren Biomassearten gelistet ¹⁰. Durch den Anstieg der Biodieselproduktion ist Glycerin als Substrat für die biobasierte Chemikalienproduktion ausreichend verfügbar. Von 10 L produzierten Biodiesel entsteht etwa 1 L Glycerin als sogenanntes Kuppelprodukt ¹². Dadurch wurden im Jahr 2017 fast 2,9 Millionen Tonnen Rohglycerin weltweit produziert ¹³, während Deutschland als größter Glycerinproduzent der Europäischen Union etwa 310 000 Tonnen im Jahr herstellt ⁸. Daraus ergibt sich die attraktive Möglichkeit, Glycerin in hochwertigere Produkte umzuwandeln. Es eignet sich zum Beispiel als Substrat für die fermentative Herstellung von Bernsteinsäure ¹⁴. Unter Anwesenheit von überschüssigem Kohlenstoffdioxid (CO₂) wird Bernsteinsäure über einen redoxausgeglichenen Weg gebildet. Die Nettobilanz für die Bildung von Bernsteinsäure aus Glycerin kann wie folgt zusammengefasst werden:



Für diese Reaktion ist der theoretisch maximale Ertragskoeffizient bezogen auf die Masse 1,28 g/g. Die Erhaltung des Redox-Gleichgewichts ist dabei essenziell für die Lebensfähigkeit der Zellen und den Stoffwechsel.

Dagegen ist die Bernsteinsäureproduktion ausgehend von Glucose hinsichtlich des Redox-Status nicht ausbalanciert und erzielt ohne externe Reduktionskraft nur einen theoretisch maximalen Ertragskoeffizienten von 1,14 g/g ¹⁴. Die Nettobilanz für die Bildung von Bernsteinsäure aus Glucose lautet ¹⁵:



Zusätzlich wird bei der anaeroben Kultivierung mit Glucose als Nebenprodukt Essigsäure gebildet, welche den Ertrag an Bernsteinsäure verringert und folglich die Aufreinigung schwieriger und kostspieliger gestaltet ¹⁶.

Glycerin stellt im Vergleich zu Glucose eine höher reduzierte Kohlenstoffquelle dar, sodass die Umwandlung von 1 mol Glycerin zu Pyruvat 2 mol NADH hervorbringt. Aufgrund des höheren Reduktionsgrades ist die Bildung von Bernsteinsäure aus Glycerin vorteilhaft, während deren Entstehung aus Zuckern, durch die Verfügbarkeit an Reduktionsäquivalenten, begrenzt ist ¹⁷.

2.2 Bernsteinsäure

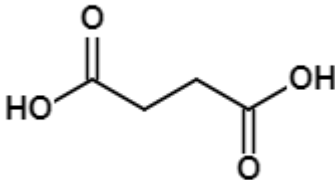
2.2.1 Eigenschaften

Bernsteinsäure, nach IUPAC-Nomenklatur als 1,4-Butandisäure geführt, ist eine geruchlose Carbonsäure, deren farblose Kristalle als kristallines Pulver weiß erscheinen. Der Begriff „Succinat“ leitet sich vom lateinischen Wort *succinum* für Bernstein ab. Im Jahr 1546 entdeckte Georgius Agricola Bernsteinsäure bei der trockenen Destillation durch Erhitzen, der sogenannten Pyrolyse, eines Bernsteins.

Bernsteinsäure kommt in Tieren, in den unreifen Früchten der Tomate und des Rhabarbers, in Algen, Menschen sowie Mikroorganismen vor und spielt daher eine wichtige Rolle im biologischen Metabolismus. Während Bernsteinsäure im Bernstein gebunden als Ester vorliegt, sind ihre Salze, die sogenannten Succinate, als Stoffwechselzwischenprodukte von Bedeutung. Sie entstehen im Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus beim Abbau von Glucose als Zwischenstufe bei der Regeneration des Akzeptors Oxalacetat, aber auch im Glyoxylat-Weg.

Des Weiteren ist Bernsteinsäure als Lebensmittelzusatzstoff unter der Bezeichnung E 363 zugelassen. Hierbei dient er als Säureregulator und ist vor allem in Getränkepulver, Soßen, Brühen, Trockensuppen sowie Desserts zu finden.

Tabelle 2: Physikalische und chemische Eigenschaften der Bernsteinsäure (SDB, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Allgemeines	
Summenformel	C ₄ H ₆ O ₄
Strukturformel	
CAS-Nummer	110-15-6
EG-Nummer	203-740-4
Physikalische und chemische Kenngrößen	
Molare Masse	118,09 g/mol
Löslichkeit	58 g/L (bei 20 °C, in Wasser)
pH-Wert	2,7 bei 10 g/L (20 °C)
pK _s -Werte	1.) 4,17 2.) 5,64
Dichte	1,56 g/cm ³ (20 °C)
Schmelzpunkt	185 – 190 °C
Siedepunkt/Siedebereich	235 °C bei 1013 hPa
Flammpunkt	ca. 206 °C
Zersetzungstemperatur	> 235 °C

2.2.2 Weltmarkt für Bernsteinsäure

Das U.S. Department of Energy listete Bernsteinsäure im Jahr 2004 unter den „Top 12“ Chemikalien, die biotechnologisch aus Zuckern hergestellt werden können ¹⁸. In der aktualisierten Liste von 2010 gehörte sie abermals zu den zehn wichtigsten Grundchemikalien, deren Produktion aus Biomasse erfolgen kann ¹⁹. Bernsteinsäure wird als zukünftiger wichtiger Building Block bezeichnet ²⁰. Sie bildet den Ausgangsstoff für eine große Vielfalt an chemischen Endprodukten. Aufgrund seiner funktionellen Gruppen kann Bernsteinsäure katalytisch in eine Vielzahl von Intermediaten umgewandelt werden. Zu den wichtigsten Derivaten für verschiedene Industriezweige, die aus Bernsteinsäure hervorgehen können, zählen:

- Maleinsäure und Maleinsäureanhydrid
- Tetrahydrofuran (THF, wichtiges Lösemittel und Vorstufe von Polytetramethylenetherglycol PTMEG = Polytetrahydrofuran (PTHF) - Vorprodukt für die Synthese von Textilfasern)
- γ-Butyrolacton (GBL, Vorstufe für Pestizide, Herbizide und Pharmazeutika)
- 1,4-Butandiol (BDO, Vorstufe für Polyester)

- Adipinsäure (Vorstufe von Nylon x,6)
- sowie verschiedene Pyrrolidone (wie bspw. N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), wichtiges Lösemittel in der chemischen Industrie und bei Lithium-Ionen-Batterien).

Zusätzlich hat Bernsteinsäure das Potential als Substrat für die Produktion biobasierter Polymere wie Polybutylensuccinat (PBS) und anderer Polyester zu dienen und dadurch die Marktgröße von Bernsteinsäure auszuweiten ^{21–23}. Die Ester und Salze der Bernsteinsäure sowie weitere Bernsteinsäurederivate haben vielfältige Verwendungsmöglichkeiten und können für weitere Umwandlungen verwendet werden ²⁴.

Bernsteinsäure findet Anwendung als Lösemittel und Weichmacher für Kunststoffe und Wachse. In der Lebensmittelindustrie wird Bernsteinsäure als pH-Regulator und Aromastoff eingesetzt. In den Bereichen der Agrar- und Pharmaindustrie dient Bernsteinsäure als Additiv für Tierfutter sowie bei der Zubereitung von Arzneimitteln ²⁵.

Für das Jahr 2020 wird prognostiziert, dass die Nachfrage nach Bernsteinsäure auf eine voraussichtliche Marktgröße von über 700000 Tonnen pro Jahr angestiegen sein wird ^{26–28}. Im Jahr 2013 betrug die globale Bio-Bernsteinsäureproduktion 38000 Tonnen bei einem gesamten biobasierten Marktwert von \$ 108 Millionen, was bereits knapp die Hälfte des Weltmarkts ausmachte. Folglich belief sich die Marktgröße von petrochemisch hergestellter Bernsteinsäure auf etwa 40000 Tonnen mit einem Marktwert von \$ 100 Millionen. Der aktuelle Marktpreis von biobasierter Bernsteinsäure beträgt 2,80 bis 3,00 \$/kg, während der fossiler Bernsteinsäure mit 2,40 bis 2,60 \$/kg anzugeben ist ²⁸. Damit biobasierte Bernsteinsäure konkurrenzfähig zu petrochemischer wird, sollten die Produktionskosten zwischen 0,55 – 1,10 \$/kg liegen ²⁶. Aufgrund der identischen Struktur von biobasierter und petrochemisch hergestellter Bernsteinsäure kann diese als „Drop-in“-Lösung ²⁹ in bestehende Anlagen integriert werden.

2.2.3 Gewinnung und Darstellung

2.2.3.1 Petrochemische Herstellung

Bernsteinsäure wird derzeit über einen chemischen Prozess ausgehend von n-Butan über Maleinsäureanhydrid unter Verwendung der C4-Fraktion von Naphtha, einem Rohbenzin, das durch fraktionierte Destillation gewonnen wird, hergestellt. Dabei sind verschiedene Synthesewege bekannt. In der Regel erfolgt eine katalytische Hydrierung der Maleinsäure, des Maleinsäureanhydrids oder der Fumarsäure zum Bernsteinsäureanhydrid bei Temperaturen von 120 – 180 °C und unter Verwendung metallischer Redoxkatalysatoren, basierend auf Nickel, Palladium oder Kupfer (Ni, Cu, NiO, CuZnCr, Pd-Al₂O₃, Pd-CaCO₃) ²⁴. Die allgemeine Reaktionsgleichung der petrochemisch hergestellten Bernsteinsäure aus Maleinsäure kann folgendermaßen dargestellt werden:



Demnach entsteht mittels Hydratation des Bernsteinsäureanhydrids die Bernsteinsäure, welche durch Kristallisation und anschließender Filtration abgetrennt und im Folgenden getrocknet wird ^{30,31}. Alternativ ist auch die Oxidation von 1,4-Butandiol (BDO) möglich, hierbei existieren verschiedene technische Wege. Die geringe Marktgröße von nur etwa 70000 - 80000 Tonnen Bernsteinsäure im Jahr 2014 ²⁰ ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die verfügbaren Bernsteinsäure-Derivate direkt aus erdölbasierten Chemikalien produziert wurden, ohne die Bernsteinsäure-Route zu durchlaufen ³².

2.2.3.2 Biotechnologische Produktion

Alternativ kann Bernsteinsäure mittels Fermentation hergestellt werden, da sie ein Zwischenprodukt des Tricarbonsäurezyklus (Citratzyklus) und eines der Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels ist. Einst als wirtschaftlich attraktive Option gehandelt ³³, macht es derzeit vor allem die Entwicklung des Rohölpreises (Abbildung 2) unmöglich, mit dem fossilen Markt zu konkurrieren.

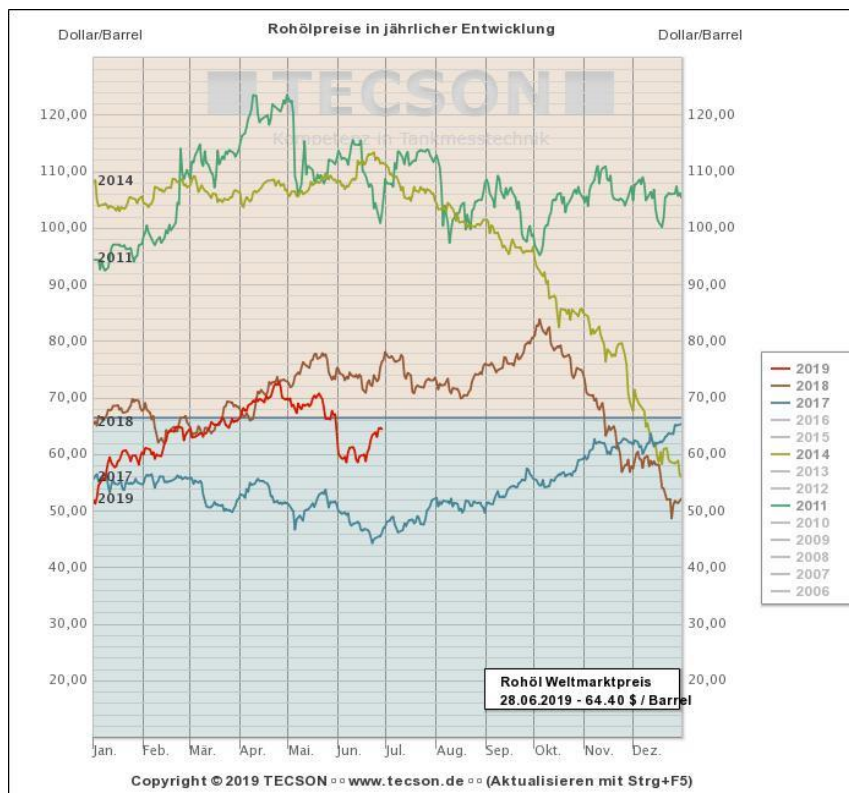


Abbildung 2: Rohölpreise in jährlicher Entwicklung für die Jahre 2011 (grün), 2014 (gelb), 2017 (blau), 2018 (braun) und 2019 (rot), Stand: Juni 2019 ³⁴

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Prozesse für die mikrobielle Produktion von Bernsteinsäure aus biobasierten Rohstoffen entwickelt. Speziell auch im Hinblick darauf, dass die Produkte nicht teurer sein sollten als konventionelle ³⁵.

Die fermentative Bernsteinsäureproduktion wird sowohl mit Wildtyp-Stämmen als auch mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVO) durchgeführt. Zu den aussichtsreichsten Wildtyp-Stämmen zählen *Actinobacillus succinogenes*, *Basfia succiniciproducens* und *Mannheimia succiniciproducens*, die aus dem Pansen von Wiederkäuern isoliert wurden ³⁶. Ferner wurde auch der Modellorganismus *Escherichia coli* gentechnisch modifiziert, sodass er für die biotechnologische Bernsteinsäureproduktion von Interesse ist. Eine Vielzahl von Substraten, wie z. B. Glucose (Stärke, Cellulose, Hydrolysate), Saccharose (Zuckerrohr, -rübe), Maltose (Stärke), Lactose (Molke), Mannitol (Stärke) sowie Xylose (Hemicellulose-Hydrolysate) und Glycerin, kann für die Fermentation eingesetzt werden.

Gegenüber der petrochemischen Herstellung liegt der größte Vorteil in der Reduktion von Treibhausgas (GHG – Green House Gase). Zum einen führt die verstärkte Nutzung nachwachsender Rohstoffe zu einer Verdrängung fossiler Energien und somit zu einer zunehmenden Vermeidung klimaschädlicher Treibhausgase ². Zum anderen wird bei der Verwendung des stark reduzierten Substrats Glycerin, je C3-Molekül, ein weiteres CO₂-Molekül aus der Luft fixiert, um beim C4-Baustein der Bernsteinsäure zu landen. So wird das Treibhausgas zu einem wichtigen Rohstoff in der Herstellung ³⁷. Weltweit wurden zahlreiche Forschungsarbeiten durchgeführt, die zur Entwicklung diverser Verfahren zur fermentativen Bernsteinsäureherstellung aus Biomasse führten. Mehrere Werke, die biobasierte Bernsteinsäure bereits kommerziell produzieren, wurden von Unternehmen wie BioAmber, Myriant, Succinity (BASF/Corbion-Purac) und Reverdia (DSM/Roquette) gegründet ^{26,32}. Während Succinity von einer Einsparung von 75 % berichtete, konnte BioAmber mit seinem Verfahren sogar 100 % GHG einsparen. Zurückzuführen ist dieser Effekt unter anderem auf die Fixierung von 1 mol CO₂ pro mol Bernsteinsäure während der Fermentation. Die von den Unternehmen verwendeten Mikroorganismen, Substrate sowie der erzielte Ertragskoeffizient und die Produktivität sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Unternehmen und Konsortien, die biobasierte Bernsteinsäure herstellen ^{20,26,38}, mit * gekennzeichnete Mikroorganismen sind gentechnisch verändert (GVO)

Unternehmen	Mikroorganismus	Substrat	Ertragskoeffizient [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]
Reverdia	<i>S. cerevisiae</i> SUC-297*	Maisstärke	1,0	1,8
BioAmber	<i>E. coli</i> (zunächst) <i>P. kudriavzevii</i> 13723* (später)	Zucker, Glycerin	0,5	1,0
Myriant	<i>E. coli</i> MH28*	Hirse	1,1	2,9
Succinity	<i>B. succiniciproducens</i> LU15224*	Glycerin, Zucker	-	0,5
Michigan Biotechnology Institute (MBI)	<i>A. succinogenes</i> 130Z	Glucose	-	0,8
MBEL, KAIST	<i>M. succiniciproducens</i> PALFK*	Saccharose, Glycerin	1,0	2,5
Mitsubishi-Ajinomoto	<i>C. glutamicum</i> *	-	-	-

Die Unternehmen setzten große Hoffnungen darauf, dass sich Bernsteinsäure zur Plattformchemikalie entwickeln wird und sich eine weitaus größere Produktpalette eröffnet ³⁵. Die aktuelle Situation zeigt allerdings auf, dass die entwickelten Technologien noch nicht konkurrenzfähig sind. Während BioAmber bereits 2018 Konkurs anmeldete, machte Reverdia im März 2019 die Mitteilung, sein Joint-Venture aufzulösen. Darüber hinaus wurde bekannt, dass die Werke von Myriant in Lake Providence, Louisiana, seit mehr als 1,5 Jahren und das von Succinity errichtete Werk in Montmeló in Spanien stillstehen ³⁹. Der Erdölpreis und die Umweltpolitik der Regierungen sind nur zwei Unsicherheitsfaktoren in dem vielschichtigen Gefüge, die den wirtschaftlichen Erfolg eines biobasierten Produktes bestimmen ³⁵.

Zur Herstellung von biotechnologisch erzeugter Bernsteinsäure zählen folgende Schlüsselfaktoren zur Etablierung eines erfolgreichen industriellen Prozesses ²⁵:

- Auswahl bzw. Entwicklung eines Produktionsstammes
- Auswahl des Rohstoffs
- Spezifische Produktivität des Bioprozesses
- Entwicklung eines effizienten Verfahrens zur Isolierung von Bernsteinsäure.

2.2.4 Stoffwechselwege der Bernsteinsäuresynthese

Bernsteinsäure, als ein Intermediat des Tricarbonsäurezyklus und eines der Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels, wird in fast allen Mikroben-, Pflanzen- und Tierzellen synthetisiert. Unter diesen Organismen werden vor allem Bakterien und Pilze als mögliche Produzenten für eine effiziente Bernsteinsäureproduktion betrachtet. Repräsentative Beispiele für Bakterien und Hefen, bei denen die Bernsteinsäureproduktion bereits kommerzialisiert wurde, sind: *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, *E. coli*, *M. succiniciproducens*, *B. succiniciproducens*, *A. succinogenes* und *C. glutamicum* ²⁶. Dabei dienen Glucose (C6) und Glycerin (C5) zumeist als Kohlenstoffquellen. Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich der Anzahl an Kohlenstoffatomen, sondern vor allem auch in Bezug auf ihre Oxidationsstufen. Durch Verwendung einer höher reduzierten Verbindung, wie z.B. Glycerin, wird die Verfügbarkeit von intrazellulärem NADH gesteigert und mehr Reduktionsäquivalente für die Synthese von Bernsteinsäure bereitgestellt. Das Cofaktor-Paar NADH/NAD⁺ hat eine zentrale Rolle im mikrobiellen Katabolismus. Unter Benutzung von NAD⁺ wird eine Kohlenstoffquelle oxidiert und Reduktionsäquivalente in Form von NADH geschaffen. Die Oxidation von NADH zu NAD⁺ ist insbesondere für das Zellwachstum von Bedeutung, da dadurch ein Redox-Gleichgewicht erreicht wird ⁴⁰.

Succinat stellt ein Schlüsselintermediat des TCA-Zyklus dar und kann als Fermentationsendprodukt unter anaeroben Bedingungen von einigen Wildtyp-Stämmen akkumuliert werden:

- *Actinobacillus succinogenes* ⁴¹
- *Mannheimia succiniciproducens* ⁴²
- *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ⁴³
- *Corynebacterium crenatum* ⁴⁴.

Obwohl die Wildtyp-Stämme bereits Bernsteinsäure in hohen Konzentrationen produzieren können, verhindern die hohen Kosten für die Kultivierungsmedien eine Kommerzialisierung. Verschiedene Strategien wurden daher entwickelt, um die Akkumulation von Bernsteinsäure zu verstärken:

- Deletion von Stoffwechselwegen, die zur Anhäufung von Nebenprodukten führen
- Verbesserung des Substrattransportes
- Verstärkung der Stoffwechselwege, die direkt zur Bernsteinsäureproduktion führen
- Optimierung des Cofaktor-Metabolismus.

Für die Bernsteinsäurebildung der Mikroorganismen wurden drei Stoffwechselwege ausgemacht:

- Reduktiver Zweig des TCA-Zyklus unter anaeroben Bedingungen
- Oxidativer Zweig des TCA-Zyklus unter aeroben Bedingungen
- Glyoxylat-Weg (im Wesentlichen aktiv unter aeroben Bedingungen bei Anpassung an Wachstum auf Acetat).

Eine Zusammenfassung verschiedener Bernsteinsäureproduzenten ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Aktueller Wissensstand zu verschiedenen Bernsteinsäureproduzenten in Forschung und Entwicklung mit Angaben zum Substrat, zur Bernsteinsäure-Konzentration, Ertragskoeffizient und Produktivität

Mikroorganismus	Substrat	Bernstein-säure	Ertragskoeffizient	Produktivität	Referenz
		[g/L]	[g/g]	[g/(L·h)]	
Natürliche Produzenten					
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	Glucose	106	0,8	1,34	45
	Xylose	29,4	0,68	3,41	46
<i>Basfia succiniciproducens</i> DD1	Glucose	31,7	0,63	1,32	47
<i>Actinobacillus succinogenes</i> ATCC 55618	Glycerin	29,3	1,23	0,27	48
<i>Actinobacillus succinogenes</i> GXAS 137	Zuckerrohrmelasse	64,7	0,86	1,4	49
Rekombinante Produzenten					
<i>Basfia succiniciproducens</i> LU15224	Glycerin	36,2	1,26	1,51	50
<i>Yarrowia lipolytica</i> PGC01003	Rohglycerin	42,9	0,33	0,36	51
	Glycerin	198,2	0,42	0,84	52
<i>Escherichia coli</i> MH28*	Glycerin	84,3	1,0	1,76	53
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ΔIdhA-pCRA717	Glucose	146	0,91	3,17	54
<i>Escherichia coli</i> AFP111	Glucose	99,2	1,1	1,3	55
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> LPK7	Glucose	52,4	0,76	1,8	30
<i>Corynebacterium glutamicum</i> NC-2	Lignocellulose-Hydrolysat (Xylose)	40,8	0,69	0,85	56

Die biotechnische Produktion von Bernsteinsäure erfolgt anaerob aus Zucker, überwiegend durch spezielle Bakterien, die nahezu ausschließlich aus dem Verdauungstrakt von Säugetieren isoliert wurden, oder gentechnisch veränderte Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum*.

Die Synthese von Bernsteinsäure zweigt direkt aus dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus ab. Bei Verwendung von Glucose als Substrat für die Bernsteinsäureproduktion wird diese über die Glykolyse zu den Metaboliten Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat umgewandelt. Der glykolytische Glucoseabbau wird sowohl bei aeroben, fakultativ anaeroben als auch anaeroben Bakterien durchlaufen ⁵⁷.

PEP dient dabei als Verzweigungsstelle zwischen dem C3-Stoffwechselweg, welcher Milchsäure (Lactat), Ameisensäure (Formiat), Essigsäure (Acetat) und Ethanol produziert und dem C4-Stoffwechsel, aus dem Bernsteinsäure hervorgeht. Die Bernsteinsäureproduktion aus Glucose schließt einen einzigen NADH-Generierungsschritt ein - von Glucose-6-phosphat zu PEP - bei dem aus 1 mol Glucose 2 mol NADH entstehen. Im weiteren Verlauf gibt es verschiedene NADH-Verbrauchsschritte. Theoretisch kann über den C4-Pfad aus 1 mol Glucose 2 mol Bernsteinsäure entstehen, sofern überschüssiges CO₂ vorhanden ist. Das ist allerdings nicht möglich, da 1 mol Glucose nur 2 mol NADH bereitstellt, die Synthese von 2 mol Bernsteinsäure jedoch 4 mol NADH benötigt ⁵⁸. Im bernsteinsäureproduzierenden C4-Pfad werden insgesamt 4 mol NADH für die Schritte von Oxalacetat zu Malat und von Fumarat zu Succinat benötigt. In den Nebenproduktbildenden C3-Pfaden benötigt die Bildung von Ethanol und Milchsäure (Lactat) jeweils 2 mol NADH. Folglich ist die Anforderung an NADH größer als dessen Bildung, sodass die Reduktionskraft zur Synthese von Bernsteinsäure ungenügend ist ⁴⁰.

Bei Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle werden mehr Reduktionsäquivalente in Form von NADH generiert als bei Glucose. Die Verfügbarkeit von intrazellulärem NADH wird gesteigert und eine reduziertere Umgebung geschaffen. Die Zellen verwenden das zusätzliche NADH, um metabolische Intermediate zu reduzieren, die bei der Bildung von Fermentationsprodukten ein Redox-Gleichgewicht ermöglichen. Damit Bernsteinsäure gebildet werden kann, ist während der anaeroben Kultivierung die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat (OAA) notwendig. Viele Stämme benötigen Kohlenstoffdioxid für das Wachstum, welches während der Produktion von Bernsteinsäure als Co-Substrat dient ⁵⁹. Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) fungiert als wesentliches anaplerotisches Enzym unter anaeroben Bedingungen. Die Aktivität von PEPC bestimmt den Kohlenstofffluss von PEP zu Oxalacetat oder zu Pyruvat. Je C3-Molekül wird ein CO₂-Molekül aus der Luft fixiert, dabei entsteht der C4-Baustein. Es folgt die Umwandlung des gebildeten OAAs über den reduktiven Weg des TCA-Zyklus und den Zwischenstufen Malat und Fumarat zum Zielprodukt Bernsteinsäure. Dabei fungiert die Malat-Dehydrogenase (MDH) als eines der Schlüsselenzyme des C4-Pfades. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu Äpfelsäure (Malat), wobei Äpfelsäure eine Vorstufe von Bernsteinsäure darstellt ⁶⁰. Im letzten Schritt, der Fumaratatmung, erfolgt die Umsetzung von Fumarat zu Succinat, hierbei dient Fumarat als Elektronenakzeptor. Daneben existieren konkurrierende Stoffwechselwege, die, ausgehend vom Pyruvat-Pool, weitere organische Säuren

(Lactat, Formiat, Acetat) bilden. Diese sind allerdings wichtig für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts.

Der oxidative Zweig des TCA-Zyklus generiert Reduktionsäquivalente (NADH), produziert jedoch auch große Mengen CO_2 , wodurch die Kohlenstoffausbeute verringert wird ^{47,61}. Die Citrat-Synthase fungiert als Eingangsenzym in den Citratzyklus und katalysiert die Bildung der C6-Verbindung Citrat. Dabei wird die Acetylgruppe auf Oxalacetat übertragen. Die Aconitase isomerisiert im nächsten Schritt die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat. Durch Oxidation der Hydroxylgruppe des Isocitrats und anschließender Decarboxylierung entsteht durch die Isocitrat-Dehydrogenase α -Ketoglutarat. Diese Verbindung reagiert durch den α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex zur energiereichen Verbindung Succinyl-Coenzym A (CoA). Im folgenden Schritt katalysiert die Succinyl-CoA-Synthetase die Reaktion von Succinyl-CoA zu Succinat. Die Energie der Spaltung des Succinyl-CoA wird zur Bildung von ATP genutzt ⁶². Einen Überblick über die Stoffwechselwege zur Bernsteinsäurebildung zeigt Abbildung 3.

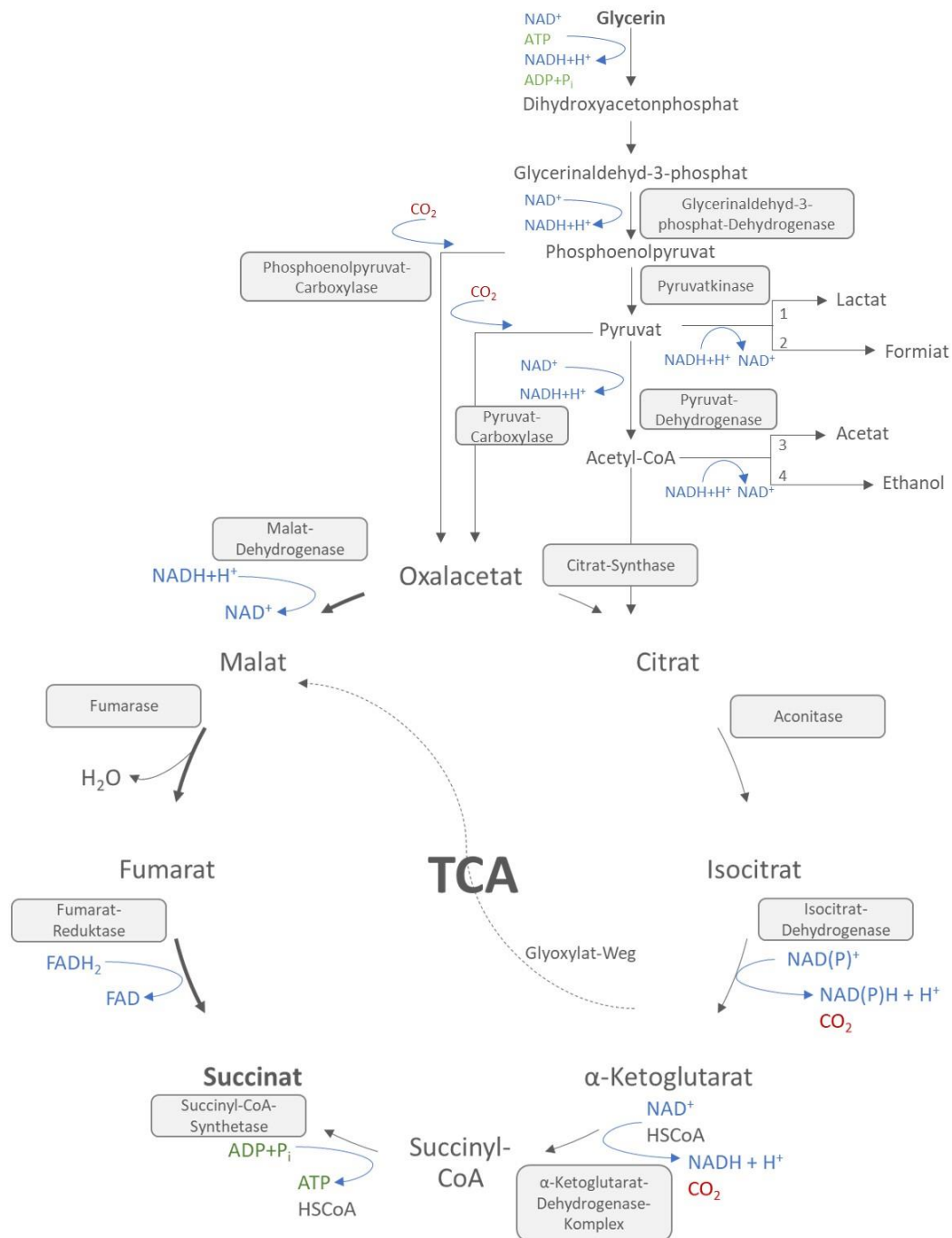


Abbildung 3: Stoffwechselwege der Bernsteinsäurebildung (1: Lactat-Dehydrogenase, 2: Formiat-Acetyltransferase, 3: Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase, 4: Acetaldehyd-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase)

2.3 Actinobacteria-Isolat

Die Actinobacteria stellen eine der artenreichsten bakteriellen Phyla dar und repräsentieren Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt, der von 50 mol % bis mehr als 70 mol % reicht^{63–65}. Neben der gleichnamigen Klasse existieren noch 5 weitere Klassen. Zusammen mit den Firmicutes bilden sie die größte Gruppe der Gram-positiven Bakterien⁶⁴. Typische Habitate für

Actinobacteria-Mitglieder sind Böden und Gewässer. Darüber hinaus kommen sie als Krankheitserreger, Pflanzenkommensale, stickstoffbindende Symbionten und Bewohner des Magen-Darm-Traktes vor ⁶⁶. Das Erscheinungsbild der Actinobacteria variiert von Stäbchenformen über Kokken und Coryneformen. Einige Vertreter sind filamentös und mehrzellig, viele können Endosporen bilden. Die Stoffwechselwege sind vielfältig und können als chemoorganotroph und heterotroph gekennzeichnet werden. Organische Verbindungen werden sowohl als Energiequelle wie auch zum Aufbau zelleigener Stoffe verwendet. Dies erfolgt über aerobe Atmung oder Gärung, wobei ihr Verhalten zum in der Luft enthaltenen Sauerstoff von obligat aerob, fakultativ anaerob über mikroaerophil oder obligat anaerob variieren kann ⁶⁴.

Actinomyces ist eine wichtige Gattung innerhalb der Ordnung *Actinomycetales*, Klasse Actinobacteria und Phylum Actinobacteria. Die Gattung *Actinomyces* wurde als sehr vielfältig eingestuft, und in einem phylogenetischen Baum, der auf 16S rRNA basiert, zeigte sie eine polyphyletische Verzweigung ⁶⁷. Sie besteht derzeit aus 47 Arten und 2 Unterarten ⁶⁸. Vertreter der Gattung *Actinomyces* sind Gram-positive, unbewegliche, nicht sporenbildende, nicht säurefeste, pleomorphe Stäbchenbakterien. Die heterologe Morphologie reicht von lang verzweigten Filamenten bis zu kokkobazillären Formen. Einige Arten bilden kleine, verzweigte Myzelien. Langfädige Formen und Myzelien vermehren sich gelegentlich durch Segmentation, also dem Zerfall in kurze Zellen ⁶⁷. Bei einigen Arten wird durch eine hohe CO₂ - bzw. HCO₃⁻ -Konzentration im Kulturmedium ein Wachstum unter aeroben Bedingungen ermöglicht ⁶⁷. Charakteristischerweise werden verschiedene Zucker zu hauptsächlich Succinat und Lactat vergärt, in kleineren Mengen auch zu Acetat und Formiat ⁶⁹.

2.4 *Paenibacillus lautus*

Die Gattung *Paenibacillus lautus* (*lautus* = gewaschen, glänzend; glasige Kolonien) gehört zur Abteilung der Firmicutes und wurde aus dem Boden und menschlichen Faeces isoliert. Der zur Risikoklasse 1 gehörende, Gram-positive, fakultativ anaerobe Organismus zeigt sich als bewegliche Stäbchen mit runden Enden, welche eine Breite von 0,5 bis 1,0 µm und eine Länge von 4,0 bis 7,0 µm aufweisen. Sie treten einzeln oder in Paaren auf. Die ellipsoiden Sporen liegen oft subterminal in geschwollenen Sporangien vor. Der Organismus wächst auf gewöhnlichem Medium wie Nutrient Agar und produziert runde bis unregelmäßig geformte, leicht konvexe, grau-weißliche Kolonien, die bei 3-tägiger Inkubation bei 30 °C einen Durchmesser von 1 bis 2 mm haben (Abbildung 4).

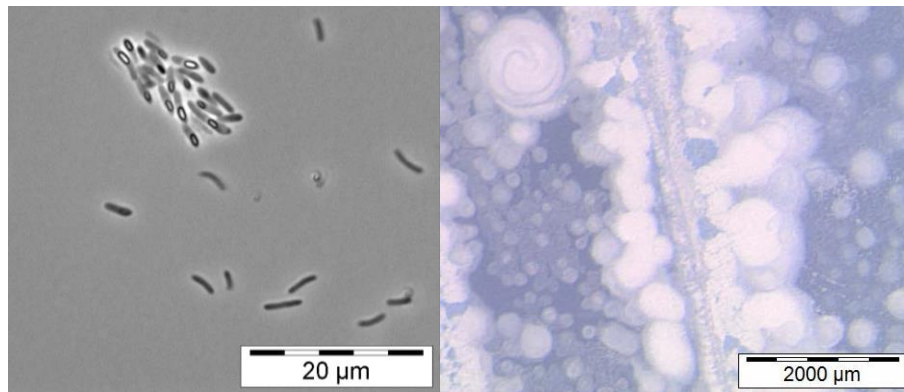


Abbildung 4: *Paenibacillus lautus* DSM 13411 auf Nutrient Agar nach 6 Tagen Inkubationsdauer

Die Kolonien haben eine butterartige Konsistenz und die Tendenz sich in Form von Mikrokolonien über die Agaroberfläche auszubreiten. Die Vermehrung ist in einem Temperaturbereich von 5 - 10 °C bis 45 – 50 °C möglich, das Optimum liegt bei 28 – 30 °C ⁶⁸.

2.5 Mikrobiologische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen

2.5.1 Sauerstoffbedarf

Hinsichtlich ihres Sauerstoffbedarfs und ihrer physiologischen Fähigkeiten lassen sich Mikroorganismen häufig identifizieren oder zumindest einer physiologischen Gruppe zuordnen. Die Ermittlung des Sauerstoffbedarfs erfolgt durch Suspendieren der Mikroorganismen in halbflüssigem Nähragar ⁵⁷. Während das Reduktionsmittel Thioglykolat dem Ansatz beigelegt wird, dient Methyleneblau als Farbindikator bei der Ausbildung der Wachstumszonen. Die Kultivierung wird in mit Überwurfkappen verschlossenen Kulturröhrchen durchgeführt. Das Reduktionsmittel bewirkt, dass der Sauerstoffpartialdruck innerhalb der Suspension sehr niedrig ist, wodurch sich die Wachstumszonen der Mikroorganismen entsprechend ihres Sauerstoffbedarfs im Kulturröhrchen anordnen (Abbildung 5).

Es wird unterschieden zwischen:

- obligat aerob
- obligat anaerob
- mikroaerophil
- fakultativ anaerob
- aerotolerant.

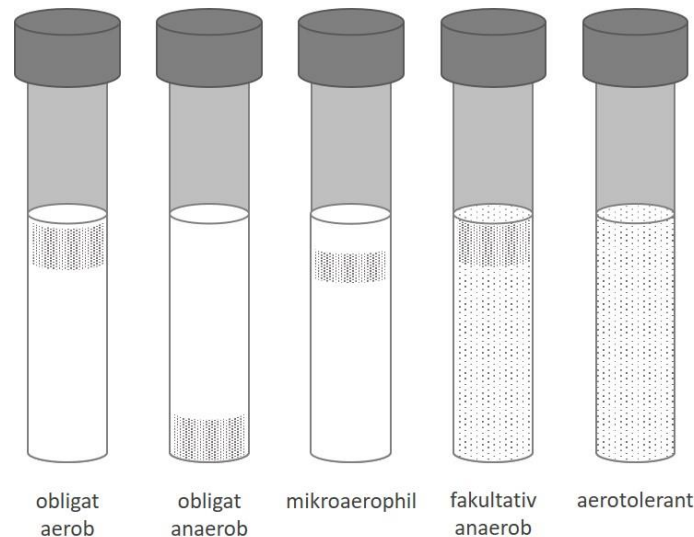
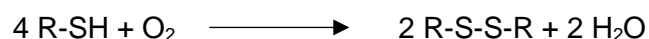


Abbildung 5: Wachstumsverhalten von Mikroorganismen in Thioglykolatbouillon hinsichtlich des Sauerstoffbedarfs

Aerobe Mikroorganismen wachsen an der Oberfläche in dem Bereich mit der höchsten Sauerstoffkonzentration, mikroaerophile dagegen etwas unterhalb dieser Zone, bei der die Sauerstoffkonzentration deutlich geringer ist als bei Sättigung mit Luft. Fakultativ anaerobe lagern sich im gesamten Kulturröhrchen an, jedoch wird der aerobere Bereich bevorzugt. Strikt anaerobe Mikroorganismen, die für ihren Stoffwechsel keinen molekularen Sauerstoff benötigen, wachsen nur in der sauerstofffreien Zone am Boden des Röhrchens ⁵⁷. Natrium-Thioglykolat, welches als Reduktionsmittel fungiert, schafft anaerobe Bedingungen durch Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Dabei reagieren die in Thioglykolat enthaltenen Thiolgruppen zu Disulfiden. Die allgemeine Reaktion eines Thiols mit Luftsauerstoff zu einem Disulfid und Wasser lautet:



Als Indikator zeigt Methylenblau die Anwesenheit von Sauerstoff an. Während der oxidierte Zustand als blau erscheint, zeigt eine Entfärbung des Mediums den reduzierten Zustand an.

2.5.2 „most probable number“-Verfahren (MPN-Verfahren)

Das MPN-Verfahren ist ein statistisches Verfahren und dient der Ermittlung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl. Diese Methode wird eigentlich zur Bestimmung der Keimkonzentration eingesetzt, wobei der „Keim“ als ein vermehrungsfähiger Mikroorganismus beschrieben wird. Das Prinzip beruht darauf, dass zunächst eine Vereinzelung der Mikroorganismen erzielt wird und anschließend einzelne Kolonien auf festen Kulturmedien vermehrt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit kann diese Methode auch zur Gewinnung von Reinkulturen eingesetzt werden. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass die Probenmengen und die Verdünnungsgrade

beim MPN-Verfahren genau bekannt sein müssen, sodass eine quantitative Auswertung möglich ist.

Die Durchführung erfolgt in mehreren parallelen Verdünnungsreihen, dabei sollten die Reagenzröhrchen über mindestens drei aufeinander folgende Verdünnungsstufen beimpft werden. Die Verdünnung erfolgt in 10er Schritten, mit jeweils 900 μL Verdünnungslösung (NaCl) und 100 μL Probe. In Abbildung 6 ist das Schema des MPN-Verfahrens zur Gewinnung von Reinkulturen dargestellt.

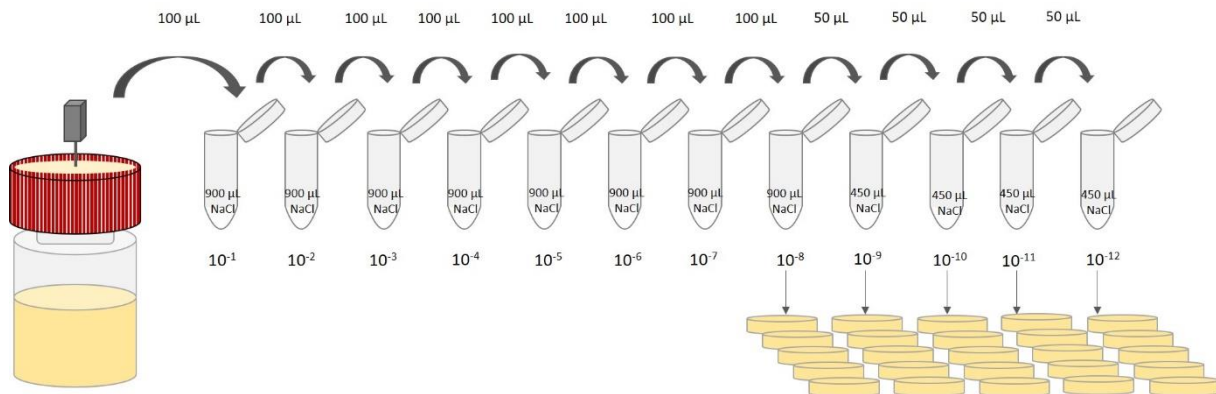


Abbildung 6: Schema des MPN-Verfahrens zur Gewinnung von Reinkulturen

Die Verdünnungsreihen werden anschließend bei geeigneter Temperatur inkubiert. Aus der Anzahl bewachsener Kulturen kann die Anzahl vermehrungsfähiger Keime bestimmt oder aber eine Reinkultur gewonnen werden.

2.5.3 KOH-Test

Die Durchführung des KOH-Tests dient der Differenzierung des Gram-Verhaltens, basierend auf ihrer Viskosität durch freigesetzte chromosomale DNA, wenn sie mit 3 %iger Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung gemischt wird. Gram-negative Zellen haben eine dünne Zellwand mit einschichtigem Murein, die durch 3 %ige KOH-Lösung leicht aufgebrochen werden kann. Gram-positive Zellen halten der Lyse durch die KOH-Lösung aufgrund ihrer dicken Zellwand aus mehrschichtigem Murein, der Peptidoglycan, stand. Dazu wird ein Tropfen der Lösung auf einen Objektträger gegeben. Mit einer sterilen Spitze wird eine ausreichend große Menge Bakterienmasse von einer frisch kultivierten Agarplatte entnommen und das Zellmaterial anschließend mit dem KOH-Tropfen auf dem Objektträger vorsichtig vermischt. Bei Gram-negativen Zellen entsteht in kurzer Zeit eine viskose Masse. Lysiert die Zellwand, bewirkt der hohe pH-Wert der KOH-Lösung, dass die DNA eine schleimige Konsistenz bekommt und bei vorsichtigem Anheben der Spitze Fäden ausgebildet werden. Beim Vermischen von Gram-positiven Zellen mit der KOH-Lösung ändert sich die Viskosität nicht.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Seelze, Deutschland) und Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) bezogen.

Reinstwasser zum Ansetzen der Lösungen wurde mittels eines Direct-Q® Wasseraufbereitungssystems von Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) erzeugt.

Als Standard-Substratquelle wurde Glycerin in Pharmaqualität ($\geq 98\%$, Carl Roth GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Die verwendeten Rohglycerine K501 und K602 wurden von Biopetrol Schwarzheide GmbH (Standort Schwarzheide) bezogen. Hierbei handelte es sich um Glycerin, welches aus Raps bei der Biodieselproduktion als Abfallprodukt anfällt. Diese wurden zu Beginn der Prozesskette entnommen und haben daher nur eine geringe Aufarbeitung erfahren. Die Rohglycerine K501 und K602 unterschieden sich dahingehend, dass zu einem früheren Zeitpunkt beim Hersteller aus Kostengründen eine Prozessumstellung erfolgte, die dazu führte, dass zum einen der verwendete Katalysator Kaliummethylat (K501) gegen Natriummethylat (K602) und die für die Biodieselwäsche eingesetzte Schwefelsäure (K501) gegen Salzsäure (K602) ausgetauscht wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Rohglycerine (Herstellerangaben), Werte übernommen aus ⁶⁹

Rohglycerin	K501	K602
Glyceringehalt [%] (Herstellerangabe)	48,0	47,3
Wassergehalt [%]	44,4	49,4
pH-Wert [-]	6,2	5,6
Chlorid [ppm]	10	> 30000
Aschegehalt [%]	3,4	n.b.
Fettsäuregehalt [%]	n.b.	1,0
Glyceringehalt (mittels HPLC ermittelt) [% (w/w)]	46,5	47,3

3.2 Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendete Mischkultur wurde als Mischkultur DSM 32268 bezeichnet. Diese ging aus Bodenproben eines vorangegangenen Projekts am Institut für Agrartechnologie (Thünen-Institut, Braunschweig, Deutschland) hervor und stellte sich für die biotechnologische Bernsteinsäureproduktion als aussichtsreich dar⁷⁰. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Gram-positiven Mikroorganismen gearbeitet.

Eine Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens durch das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (HZI) identifizierte das Bodenisolat als neuartige Gattung der Klasse Actinobacteria. Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erteilte dem Isolat schließlich die DSM-Nummer 32268. Zusätzlich wurde beim HZI DNA aus dieser Probe isoliert und das zu analysierende Genfragment vervielfältigt. Bei der Sequenzierung wurden die DNA-Sequenzen jedoch der Spezies *Paenibacillus lautus* zugeordnet. Die variable Genregion der 16S rRNA wurde erneut durch gezielte Amplifikation angereichert und sequenziert. Fortan wurde nur letztgenannter sporenbildender Stamm der Gattung *Paenibacillus* bestimmt. Eine Totalsequenzierung des Bakteriengenoms des Actinobacteria-Isolats sowie dessen taxonomische Einordnung konnten daher nicht durchgeführt werden. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem bei der DSMZ unter der Nummer 32268 gelagerten Stamm um eine Mischkultur aus einer neuartigen Gattung der Klasse Actinobacteria und der Spezies *Paenibacillus lautus* handelte.

Zur Kontrolle und für vergleichende Analysen wurde der Mikroorganismus *Paenibacillus lautus*, bei der DSMZ unter der DSM-Nummer 13411 geführt, hinzugezogen.

3.3 Medien

Für die Zubereitung aller Medien wurde deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von $\sigma \leq 20 \mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Die Sterilisation der hergestellten Medien und Lösungen erfolgte durch Autoklavieren (Autoklav DX-23, Systec GmbH, Linden, Deutschland) bei 121 °C für 20 min und 1 bar Überdruck.

3.3.1 Nährstoff-Medium

Das Nährstoff-Medium ist ein Mehrzweckmedium und diente zur Kultivierung der Mikroorganismen, aber auch zum Nachweis auf Vorhandensein des sporulierenden Stammes *Paenibacillus lautus* in mikrobiologischen Isolierungsexperimenten. Das Medium wurde sowohl als Nährbouillon (Nutrient Broth) als auch als Nähragar (Difco™ Nutrient Agar, BD Biosciences, BD Diagnostics, Sparks, Maryland, USA) verwendet.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Difco™ Nutrient Agars

Substanz	Menge
Difco Nutrient Agar	23,0 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 mL

Tabelle 7: Zusammensetzung der Nutrient Broth

Substanz	Menge
Fleischextrakt	3 g
Trypton/Pepton aus Casein	5 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 mL

3.3.2 LB-Medium nach Lennox

Dieses Standard-Medium wurde zur Anzucht und Vermehrung der Mikroorganismen verwendet. Zur Überprüfung der Reinheit des Actinobacteria-Isolates wurden LB-Agarplatten benutzt, die die gleiche Zusammensetzung wie LB-Medium nach Lennox haben, zusätzlich aber mit Agar versetzt wurden. Als zusätzliche Selektivquelle für das Actinobacteria-Isolat diente die Zugabe von Pharmaglycerin mit einer Konzentration von 100 g/L.

Tabelle 8: Zusammensetzung des LB-Mediums nach Lennox

Substanz	Menge
Hefeextrakt	5 g
Trypton/Pepton aus Casein	10 g
Natriumchlorid (NaCl)	5 g
Glycerin	100 g
Agar (optional)	15 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 mL

3.3.3 Actinomycete Isolation Agar

Actinomycete Isolation Agar wurde zur Isolierung und Vermehrung von *Actinomyces* in mikrobiologischen Isolierungsexperimenten verwendet, dargestellt in Tabelle 9.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Actinomycete Isolation Agars

Substanz	Menge
L-Asparagin	0,1 g
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	0,5 g
Eisen(II)sulfat Heptahydrat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,001 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,1 g
Caseinhydrolysat	2 g
Calciumpropionat	4 g
Agar	15 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 mL

3.3.4 Standardproduktionsmedium

Zur Produktion von Bernsteinsäure durch die Mischkultur DSM 32268 wurde das in Tabelle 10 dargestellte Komplexmedium verwendet. Aufgrund seiner standardisierten Nutzung zur Herstellung von Vor-, Zwischen- und Produktionskulturen wurde es im Weiteren als Standardproduktionsmedium bezeichnet.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Standardproduktionsmediums zur Bernsteinsäureproduktion

Substanz	Menge
Lösung A	
Glycerin	100 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton/Pepton aus Casein	5 g
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)	1,5 g
Lösung B	
Natriumchlorid (NaCl)	1 g
Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄)	1 g
Lösung C	
Calciumchlorid-dihydrat (CaCl₂·2H₂O)	0,265 g
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	0,094 g
Phosphorsäure (H₃PO₄, 1 M)	9 mL
Salzsäure (HCl, 1 M)	30 mL
Magnesiumcarbonat (MgCO₃)	100 g
Deionisiertes Wasser	ad 1000 mL

Die Lösungen A, B und C wurden separat hergestellt. Während Lösung A über Autoklavieren sterilisiert wurde, wurden die Lösungen B und C 100-fach konzentriert angesetzt und mittels Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) angefertigt. Die präparierten Stammlösungen wurden bis zur weiteren Verwendung in 50 mL Schraubröhren (Polypropylen (PP), 50 mL, Spitzboden, 114 · 28 mm, steril, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) bei 4 °C gelagert. Bei Gebrauch des Standardproduktionsmediums wurden Lösung A, B und C zusammengefügt und 1 M Phosphorsäure sowie 1 M HCl nach den Angaben aus Tabelle 10 zugegeben.

3.3.5 LentiKat[®]-Medium

Zur Anzucht der Zellen, die für die LentiKat[®]-Herstellung eingesetzt wurden, wurde Standardproduktionsmedium (3.3.4) verwendet. Für die Wachstumsphase der Zellen in den LentiKats[®] sowie für die Produktionsphase der immobilisierten Zellen wurde das

Standardproduktionsmedium abgeändert. Es wurde auf Trypton/Pepton verzichtet und die Konzentration an Hefeextrakt auf 10 g/L erhöht.

3.3.6 Thioglykolat-Nährmedium

Zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs der Mikroorganismen wurde das Thioglykolat-Nährmedium nach Brewer ⁷¹ eingesetzt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Thioglykolat-Nährmediums

Substanz	Menge
Hefeextrakt	5 g
Trypton/Pepton aus Casein	10 g
Natriumchlorid (NaCl)	5 g
Glycerin	100 g
Agar	0,5 g
Natrium-Thioglykolat	0,5 g
Methylenblau (0,5 %)	2 mg
Deionisiertes Wasser	ad 1000 mL

Im Anschluss an das Autoklavieren wurden 10 mL Medium in ein Reagenzglas gefüllt. Anschließend wurden 100 µL einer Kultursuspension hinzugegeben und das Reagenzglas mit einem Schraubdeckel verschlossen. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 32 °C inkubiert. Eine optische Überprüfung der Wachstumsphasen bezüglich des Sauerstoffbedarfs wurde am folgenden Tag durchgeführt.

3.4 Stammhaltung und Kultivierung

3.4.1 Kryokonservierung

Für die Stammhaltung und zum Beimpfen von Vorkulturen wurden Kryokulturen benutzt. Zellkulturen können durch Kryokonservierung nahezu unbegrenzt gelagert werden. Die Zellen werden in sterilen Glycerin-Suspensionen (ca. 50 Vol.-%) bei -80 °C eingefroren. Diese wurden auf folgende Art erstellt:

Um Bakterien aus Ampullen zu reaktivieren, wurden 0,5 mL Standardproduktionsmedium mit je 5 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat steril zum Lyophilisat gegeben und dieses gelöst. Ein Volumen von 300 µL der Suspension wurde zur Inokulierung von 5 mL desselben Mediums verwendet. Die Anzucht wurde im Schüttelinkubator bei 32 °C und 150 rpm in Laborflaschen (aus Borosilicatglas mit DIN GL-Gewinde 45, SIMAX®, Bohemia Cristal Handelsgesellschaft

mbH, Selb, Deutschland) mit Kanüle (aus Chrom-Nickel-Edelstahl, 1,6 · 25 mm, mit Gewinde, HSW-PREMIUM®, Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) und Septum (aus Silikonkautschuk, Dicke 3 mm, Ø 42 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in der Schraubkappe (mit Bohrung, aus Polybutylenterephthalat (PBT), Gewinde GL45, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Die verwendeten Laborflaschen fassen ein Nennvolumen von 100 mL. Die Kultivierung wurde bei einer Optischen Dichte (OD_{605nm}) von etwa 4 beendet. Anschließend wurden 500 µL der Bakteriensuspension mit 500 µL sterilem Pharmaglycerin (ca. 80 Vol.-%) in Kryoröhrchen (steril, RNase- und DNase-frei, 2,0 mL, konisch, 13,5 · 48,3 mm, Nalgene®) vermengt und schließlich bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Jedes Kryo wurde nur einmalig verwendet, um Mutationen des Stammes zu vermeiden.

3.4.2 Kultivierung in Laborflaschen

Die Durchführung der Kultivierungen erfolgte in Laborflaschen mit einem Nennvolumen von 100 mL. Die zum Verschließen der Laborflaschen verwendeten Schraubkappen waren mit einer Bohrung versehen, in der Septen sowie eine Kanüle eingefasst wurden (Abbildung 7). Das Arbeitsvolumen betrug 50 mL. Unter Standardbedingungen wurde in einem Schüttelinkubator (Multitron, Infors AG, Bottmingen/Basel, Schweiz) mit 25 mm Schüttelradius bei 150 rpm und 32 °C inkubiert.



Abbildung 7: Zur Kultivierung verwendete Laborflaschen, verschlossen mit Schraubkappen mit Silikonkautschukseptum und Kanüle

Die Beprobung der Laborflaschen erfolgte durch Öffnen der Schraubkappen unter einer Sterilwerkbank (HeraSafe, HS 12 oder HS 18, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland). Nach Beendigung einer Kultivierung wurde die übrige Kultursuspension in sterilen 50 mL Schraubröhrchen (Polypropylen (PP), 50 mL, Spitzboden, 114 · 28 mm, steril, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.4.2.1 Vorkultur

Zur Herstellung von Vorkulturen wurde eine Kryokultur (Volumen: 1 mL) aufgetaut und zu 50 mL steriles Standardproduktionsmedium mit einer Glycerinkonzentration von 20 g/L gegeben. Nicht verzehrtes Glycerin aus der Kryokultur wurde verschleppt, weshalb sich die Glycerinkonzentration auf insgesamt circa 28 g/L addierte. Eine identische Menge Magnesiumcarbonat wurde in den zur Kultivierung verwendeten Laborflaschen vorgelegt. Die Kultivierung erfolgte, wie unter 3.4.2 beschrieben, für 3 Tage im Schüttelinkubator.

3.4.2.2 Arbeitskultur

Für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsansätze wurden alle Versuchsreihen mit Arbeitskulturen, im Weiteren als Zwischenkultur bezeichnet, durchgeführt, die bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert wurden. Eine Zwischenkultur wurde in regelmäßigen Abständen aus einer gelagerten Vorkultur hergestellt. Dazu wurden 50 mL Standardproduktionsmedium mit einer Glycerinkonzentration von 50 g/L und einer identischen Menge Magnesiumcarbonat mit 1 mL Vorkultursuspension inokuliert und für 3 Tage, wie unter 3.4.2 beschrieben, kultiviert.

3.4.2.3 Produktionskultur

Produktionskulturen wurden mit einem Volumen von 2 % (1 mL) einer Zwischenkultur auf 50 mL Standardproduktionsmedium inokuliert. Die Glycerin- und Magnesiumcarbonatkonzentration betrug je nach Ansatz entweder 50 g/L oder 100 g/L. Die Ansätze wurden für die Dauer von 7 beziehungsweise 14 Tage, wie unter 3.4.2 beschrieben, durchgeführt. Es handelte sich fast ausschließlich um Mehrfachansätze. Die ermittelten Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Kultivierungsansätzen mit den jeweiligen Standardabweichungen dar.

3.4.3 Probeentnahme, -verarbeitung und -lagerung

In regelmäßigen Abständen wurde während einer Kultivierung das Wachstum, die Verwertung des Substrates und die Produktion von Bernsteinsäure und Nebenprodukten überwacht. Bei jeder Probenahme wurden 1000 µL der Kultursuspension in ein Reagiergefäß (aus Polypropylen (PP), 1,5 mL, EASY CAP, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt und nach folgendem Schema (Abbildung 8) vorgegangen.

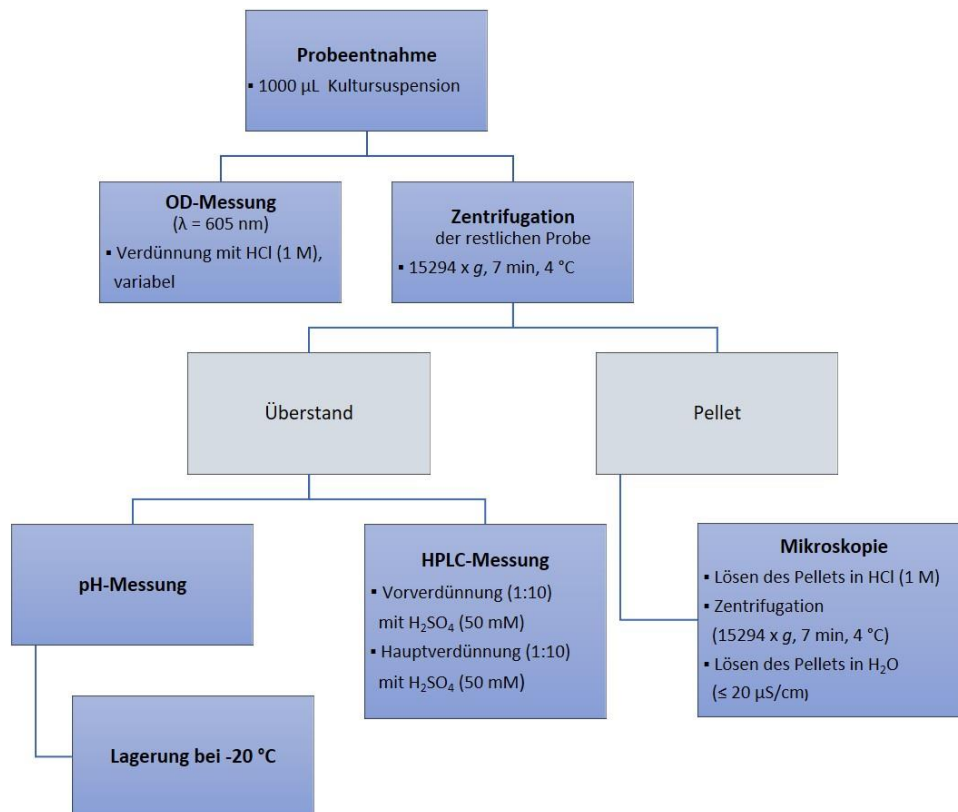


Abbildung 8: Schema der Probenverarbeitung während einer Kultivierung

Nach Verarbeitung der Probe, wie im Schema der Abbildung 8 dargestellt, erfolgte die Lagerung des verbliebenen Überstands in Reagiergefäßen bei – 20 °C im Kühlhaus.

3.5 Immobilisierung

LentiKats® sind extrem stabile Immobilisate auf Basis von Polyvinylalkohol, die aufgrund ihrer linsenartigen Form sehr gute Diffusionseigenschaften mit einer leichten Abtrennbarkeit kombinieren. Durch die Verwendung immobilisierter Biokatalysatoren (Mikroorganismen) können Biokonversionsprozesse durch Produktivitätssteigerung effizienter gestaltet werden.

Das vom Hersteller geniaLab® (Braunschweig, Deutschland) bezogene LentiKat®-Liquid 100 (80 g gebrauchsfertige Polyvinylalkohol-Formulierung) wurde mit 20 mL Bakteriensuspension mit einer Zellzahl von etwa $8 \cdot 10^9$ Zellen/mL vermengt. Die Bakteriensuspension entstammte dabei der Kultivierung einer Zwischenkultur in Laborflaschen mit Septum und Kanüle. Als Medium wurde Standardproduktionsmedium verwendet, inokuliert wurde mit 1 % einer bei 4 °C gelagerten Vorkultur. Das Liquid sollte dabei eine Temperatur von 40 °C nicht übersteigen. Zuvor wurden die Deckel von großen Petrischalen (Polystyrol (PS), 150 x 20 mm, mit Nocken, steril, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland), bei steriler Arbeitsweise, nummeriert und ausgewogen. Mit einem LentiKat®-Printer (Abbildung 9 links) wurden linsenartige

Tropfen mit einem Durchmesser von etwa 3 mm und einer Dicke von 200 – 400 µm auf die Oberfläche der Deckel geprintet (Abbildung 9 rechts) und anschließend unter einer Sterilwerkbank bis zu einer Restfeuchte von 28 % getrocknet. Die ausgewogenen Petrischalen wurden im Anschluss mit Stabilizer, welcher vom Biotechnologieunternehmen geniaLab® GmbH gebrauchsfertig bezogen wurde, benetzt. Mit einem Wischer wurden die LentiKats® nach etwa 5 Minuten von der Oberfläche gelöst und in ein mit 1 L Stabilizer-Lösung und Rührkern vorgelegtes Becherglas (Nennvolumen: 3 L) überführt. Die LentiKats® wurden in Stabilizer-Lösung etwa 3 Stunden auf einem Magnetrührer gerührt. Nach Beendigung des Vorgangs wurden die LentiKats® mit Hilfe eines Siebs von der Lösung abgetrennt und mit steriler 0,9 %iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung gespült. Zur Inkulturnahme wurden die LentiKats® anschließend in Laborflaschen abgewogen. Pro Ansatz wurden 10 - 12 g LentiKat®-Feuchtmasse auf 100 mL Standardproduktionsmedium eingesetzt. Nicht verwendete LentiKats® wurden in Laborflaschen mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung bei 4 °C dunkel aufbewahrt.

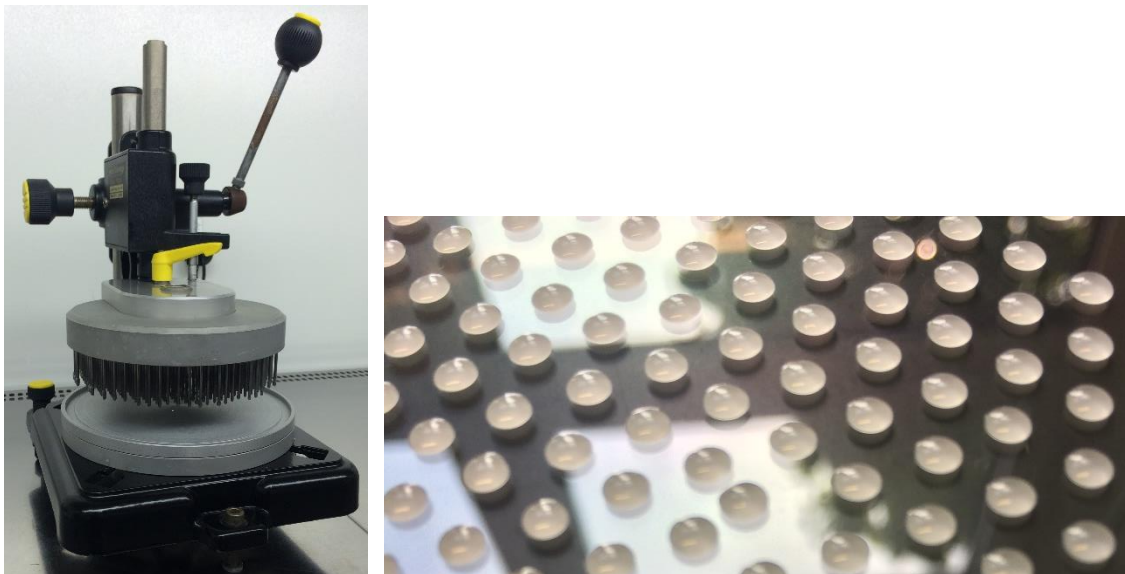


Abbildung 9: Zur Herstellung von LentiKats® verwendeter LentiKat-Printer der Firma geniaLab® (links), auf Petrischalen geprintete LentiKats® (rechts)

3.5.1 Anzucht in Schüttelkolben

In Schikanekolben mit 3 Schikanen (Nennvolumen: 250 mL) erfolgte zunächst aerob die Vermehrung der Zellen in den LentiKats®. Einer Unterversorgung mit Luft, wie sie durch die Verwendung von Laborflaschen mit Septum und Kanüle auftrat, wurde somit ausgeschlossen. Es wurden 10 g LentiKat®-Feuchtmasse zur Anzucht eingesetzt. Das Arbeitsvolumen betrug 100 mL, als Medium wurde das abgewandelte Standardproduktionsmedium, wie in 3.3.5 beschrieben, verwendet. Ein Medienwechsel mit frischem LentiKat®-Medium wurde im Intervall von 4 Tagen Kultivierungsdauer durchgeführt. Dazu wurden die immobilisierten Zellen mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen.

Ein ausreichender Bewuchs der LentiKats® zeigte sich nach 13 Tagen der Kultivierung in Schikanekolben. Die Immobilisate wurden vor der Überführung in Laborflaschen zur Produktion erneut mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült.

3.5.2 Produktion in Laborflaschen

Die Produktion von Bernsteinsäure durch die in den LentiKats® eingeschlossenen Zellen erfolgte in Laborflaschen mit Septum und Kanüle. Allerdings betrug das Nennvolumen, wie bei den Schikanekolben, 250 mL, das Arbeitsvolumen entsprechend 100 mL. Das zur Anzucht verwendete Medium (3.3.5) wurde ebenfalls eingesetzt. Ein Medienwechsel wurde jeweils nach einer Zeitspanne von 7 Tagen durchgeführt. Dazu wurden die Immobilisate mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und anschließend dem frischen Medium in den Laborflaschen wieder zugeführt.

3.5.3 Färbung mit Karbolfuchsin

Bakterien lassen sich mit basischen Farbstoffen anfärben. Diese sind dissoziierende Farbstoffe, bei denen das Kation gefärbt ist (Fuchsin). Bakterien enthalten Stoffe mit freien sauren Gruppen, an denen die gefärbten Kationen gebunden werden. Die Färbung mit Karbolfuchsin ist eine Standardfärbung der Bakteriologie und dient der Darstellung von Bakterien. Zur Einfärbung der Bakterien wurde Karbolfuchsin nach Ziehl und Neelsen („Ziehl’sche“ Lösung, Fertiglösung 1 %ig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Aus der Kultursuspension wurden einige LentiKats® steril in ein Reagiergefäß überführt und 100 µL der Lösung hinzugeben. Nach 30-minütiger Einwirkzeit wurde die Lösung abgenommen und verworfen. Die LentiKats® wurden anschließend dreimal mit 200 µL deionisiertem Wasser im Intervall von 30 min gespült und mit dem Stereo- bzw. Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Optische Dichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakteriensuspension wurde die photometrische Trübungsmessung verwendet. Durch Messen der Optischen Dichte wurde das Wachstum der Mikroorganismen während einer Kultivierung in Laborflaschen verfolgt. Die Optische Dichte wurde mit Hilfe des Zweistrahlphotometers (T80 UV/Vis Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, Lutterworth, GB) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 605 \text{ nm}$ ($OD_{605\text{nm}}$) anhand der Extinktion der Bakteriensuspension in Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol, Schichtdicke 10 mm, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gemessen und mittels Software (UVWin V5.0.5) ausgegeben. Grundlage dafür ist die Eigenschaft von Suspensionen, Licht zu streuen. Je mehr Zellen sich in der Suspension befinden, je trüber das Medium wird, desto größer die

Streuung. Als Referenz diente 1 M Salzsäure (HCl). Die Proben wurden ebenfalls mit 1M HCl so verdünnt, dass die gemessene Absorption zwischen 0,1 und 0,5 liegt. Vor der Messung wurden die Proben in der Küvette mittels Vortexer vermischt, damit keine Zellmasse sedimentierte. Bei der Berechnung der OD_{605nm} ist die Verdünnung einzubeziehen.

Die Optische Dichte, auch als Extinktion bezeichnet, beschreibt die Abnahme der Lichtintensität beim Durchtritt durch ein Medium aufgrund von Adsorption. Wird ein Lichtstrahl einer bestimmten Wellenlänge durch eine Küvette mit einer Suspension geschickt, so kann ein Teil des Lichts durch das Medium adsorbiert werden. Die Intensität des ausfallenden Lichts (I_1) ist dann geringer als die des einfallenden Lichts (I_0). Der Zusammenhang zwischen der Adsorption des Lichtes und der Konzentration des Stoffes wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz definiert:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d = - \lg \frac{I_1}{I_0}$$

- A : Adsorption
- ε : Extinktion
- D : Pfadlänge in cm
- c : Konzentration der adsorbierenden Substanz
- I_0 : Intensität des einfallenden Lichts
- I_1 : Intensität des ausfallenden Lichts

Da es während der Kultivierungen zu morphologischen Veränderungen der Zellen der Mischkultur DSM 32268 kam, konnten die gemessenen OD_{605nm} -Werte ausschließlich für den Vergleich der während dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen verwendet werden. Bei den genannten morphologischen Veränderungen handelte es sich um eine Verkleinerung der Zellen während der Produktion von Bernsteinsäure.

3.6.2 pH-Wert

Der pH-Wert wurde während einer Kultivierung in Laborflaschen extern vermessen. Dazu wurde der Überstand einer zentrifugierten Probe abgenommen, nachdem von diesem 100 μ L für die Vermessung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie entfernt wurden. Die pH-Wert-Messung erfolgte mit der pH-Elektrode (InLab® Micro, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland), die zuvor mit Pufferlösungen (Hamilton Buffer Solution, Fluka Analytical) mit pH 4,01 und pH 7,0 kalibriert wurde. Der pH-Wert wurde über das Digital-pH-Meter (pH525, WTW, Weilheim, Deutschland) ausgegeben.

3.6.3 Mikroskopie

Die Morphologie der Zellen während einer Kultivierung sowie der Nachweis von Sporen auf Nutrient-Agarplatten wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop mit dem Objektiv Plan-NEOFLUAR 100x/1,3 Oil/Ph3 (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) mit Hilfe einer Digitalkamera (Olympus XC10, Tokio, Japan) aufgenommen. Die Kolonieformen der Mikroorganismen auf festem Plattenmedium wurden zudem mittels Stereomikroskop (Zeiss SV8, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und Digitalkamera (Olympus SC30, Tokio, Japan) bei unterschiedlicher Vergrößerung festgehalten. Die Fotoaufnahmen wurden anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware (analySIS pro, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) ausgewertet.

3.6.4 Biotrockenmasse

Die quantitative Analyse der Biotrockenmasse (BTM) im Rahmen einer Kultivierung erfolgte gravimetrisch. Dazu wurde zu jedem Probenahmezeitpunkt die Gewichts Differenz zwischen beschriftetem, getrocknetem und vorgewogenem Reagiergefäß und gewaschener und getrockneter Biomasse im Reagiergefäß ermittelt:

$$BTM = \frac{m_{\text{trocken}} - m_{\text{leer}}}{V}$$

BTM : Biotrockenmasse [g/L]

m_{trocken} : Gewicht des Reagiergefäßes mit getrocknetem Pellet/Biomasse [g]

m_{leer} : Gewicht des leeren Reagiergefäßes [g]

V : Volumen der im Reagiergefäß eingesetzten Probe [L]

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2 mL Reagiergefäße (aus PP, SafeSeal, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) nummeriert und im Trockenschrank (UE 400, 230 V, Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland) bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz eingelagert. Nach der Entnahme erfolgte die weitere Trocknung und Abkühlung für 2 h im Exsikkator. Das Leergewicht jedes beschrifteten Reagiergefäßes wurde notiert. Während einer Kultivierung erfolgte zu jedem Probenahmezeitpunkt die Entnahme von 1 mL Probensuspension und die anschließende Überführung in ein beschriftetes, getrocknetes und gewogenes Reagiergefäß, welches daraufhin bei 15294 x g und 4 °C für 7 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde im folgenden Schritt verworfen. Das zurückgebliebene Pellet wurde in 1 mL 1M HCl gelöst. Durch Lösen des Magnesiumcarbonats trat starke Schaumbildung auf. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (15294 x g, 4 °C, 7 min) wurde bei vollständigem Auflösen von Pellet und Magnesiumcarbonat angefügt. Nach Abschluss wurde abermals der Überstand verworfen und der vorherige Schritt wiederholt. Befand sich am Boden des Reagiergefäßes ausschließlich das Pellet, wurde dieses in 1 mL Reinstwasser gelöst. Nach

erneuter Zentrifugation ($15294 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 min) und Abtrennen des Überstandes, wurde das Sediment bei $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend erfolgte die Überführung in den Exsikkator für etwa 2 h. Das Gewicht der getrockneten Pellets im Reagiergefäß wurde bestimmt und die Biotrockenmasse nach obenstehender Gleichung berechnet.

3.6.5 High performance liquid chromatography

Zucker und organische Säuren wurden mittels High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, HPLC) analysiert. Das Trennprinzip der HPX-87 H Trennsäule (Aminex HPX-87H, $300\text{ mm} \cdot 7,8\text{ mm}$, $9\text{ }\mu\text{m}$ Partikelgröße, Bio-Rad, Hercules, USA) beruht auf einer Kombination aus:

- Ionenaustausch-,
- Ionenausschluss (Kationen)- und
- Größenausschlusschromatographie.

Die Analyten wurden mit UV-Absorbanz bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210\text{ nm}$ (WellChrome Diode Array K-2800, Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) detektiert. Für Substanzen, die keine UV-Absorption zeigten, wurde der Brechungsindexdetektor (RI) (K-2301, Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Als mobile Phase diente $5\text{ mM H}_2\text{SO}_4$ bei einer Flussrate von $0,7\text{ mL/min}$ und einer Säulentemperatur von $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dabei wurde ein Probenvolumen von $20\text{ }\mu\text{L}$ injiziert. Die Dauer der Messung wurde auf 32 Minuten gesetzt.

Die Auswertung eines Chromatogramms einer Probe erfolgte hinsichtlich der Qualität und Quantität. Über die Retentionszeiten wurde durch Vergleich mit einem bekannten Stoff die Probe identifiziert. Die Konzentration der Substanz wurde anhand der Peakfläche durch Kalibrierung mit einem externen Standard bestimmt. Über Integration der Fläche wurde die Konzentration der Standardlösung festgelegt. Das Verhältnis der Peakflächen des Standards zum Analyten wurde verwendet, um die Probenkonzentration zu ermitteln.

Tabelle 12: Betriebsparameter der HPLC-Anlage zur Detektion der Substrate und Produkte

Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	Aminex HPX-87H (300 mm · 7,8 mm, 9 mm)	Bio-Rad, Hercules, USA	T _{Säule} : 40 °C, Flussrate: 0,7 mL, Druck: 75 – 78 bar
UV-Detektor	WellChrome Diode Array K-2800	Kanuer GmbH, Ber- lin, Deutschland	Wellenlänge 210 nm
RI-Detektor	K-2301	Knauer GmbH, Ber- lin, Deutschland	
Pumpe	Smart Pump K1001	Kanuer GmbH, Ber- lin, Deutschland	
Degaser	ERMA ERC-3215α	Erc Inc., Japan	
Autosampler	Basic Marathon AS3800	Spark Holland, Em- men, Niederlande	Probenvolumen 20 µL

3.6.6 EZ:faast™ Aminosäurebestimmung und Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor

Die Bestimmung der freien Aminosäuren im Überstand der Kultursuspension erfolgte mit Hilfe des Phenomenex EZ:faast™ Amino Acid Analysis Kit. Die EZ:faast™ Methode erlaubt die Analyse von mehr als 60 aliphatischen und aromatischen Aminosäuren. Das Kit ermöglicht sowohl die Probenreinigung als auch die Derivatisierung und die Analyse von physiologischen (freien) Aminosäuren. Zunächst wurde der Probenüberstand aus einer Kultivierung 1:5 mit Reinstwasser (Millipore) verdünnt. Als interner Standard diente Norvalin, der mit einer Konzentration von 200 nmol/mL zugesetzt wurde. Die EZ:faast™ Methode besteht aus einem Festphasenextraktionsschritt, gefolgt von einer Derivatisierung und einer Flüssig/Flüssig Extraktion. Die Festphasenextraktion, auch SPE (sorbent phase extraction) genannt, erfolgte über eine mit Sorbens gepackte Spitze. Dabei wurde die Probenlösung durch das Sorbens geleitet. Dieses bindet die freien Aminosäuren, während störende Verbindungen, wie Proteine und Harnstoff, von der Probe ausgeschlossen werden und hindurchströmen. Daher bedarf es keiner weiteren traditionellen Methode zur Deprotonierung oder Harnstoffbeseitigung. Bei der Derivatisierung werden die Aminosäuren in unpolare, leichter flüchtige Verbindungen umgewandelt. Dabei wurden die Aminosäure-Derivate von der wässrigen in die organische Phase extrahiert. Die derivatisierten Proben wurden anschließend mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) analysiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend Herstellerangaben. Die Quantifizierung der freien Aminosäuren in der Kultursuspension erfolgte über Referenzstandards anhand von substanzspezifischen Retentionszeiten bei einer

Wellenlänge von 340 nm. Die Konzentration der eindeutig zugeordneten Aminosäuren wurde aus den ermittelten Flächen ausgemacht und mit Hilfe einer 3-Punkt-Kalibrierfunktion im Messbereich von 50 – 200 nmol/mL berechnet. Die Standards wurden ebenfalls wie die Proben mit Hilfe des Kits vorbereitet und mit dem GC-FID analysiert.

Tabelle 13: Betriebsparameter des GC-FID

Komponente	Typ	Hersteller
GC-FID	GC-17A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autosampler	AOC-20i	Shimadzu, Kyoto, Japan
GC-Säule	Zebron™ ZB-AAA [10 m · 0,25 mm ID, Filmdicke: 0,25 µm]	Phenomenex, Torrance, USA
Software	LabSolutions	Shimadzu, Kyoto, Japan

Tabelle 14: Betriebsparameter des GC-FID zur Bestimmung der freien Aminosäuren in Kultursuspensionen

Komponente	Betriebsparameter
Injektion	Split 1:15
Injektionsvolumen	2,0 µL
Injektionstemperatur	300 °C
Trärgas	Wasserstoff H ₂
Temperaturprogramm	20 °C/min von 110 °C auf 250 °C 10 °C/min von 250 °C auf 320 °C bei 320 °C für 1 min halten
FID-Temperatur (Detektor)	340 °C
Gesamtlaufzeit	15 min

3.7 Datenauswertung

3.7.1 Ertragskoeffizient

Der Ertragskoeffizient (Y, für engl. yield coefficient) beschreibt die Effizienz der Bildung eines Stoffwechselendprodukts (P) in Abhängigkeit zur Menge des dafür verbrauchten Substrats (S). Er ist definiert als der Quotient aus Menge an Produkt pro verbrauchtes Substrat. Für den Fall der Produktion von Bernsteinsäure aus Glycerin errechnet sich der Ertragskoeffizient nach:

$$Y_{P/S} \quad [\text{g/g}] = - \frac{c_P^{t_2} - c_P^{t_1}}{c_S^{t_2} - c_S^{t_1}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{gebildete Menge Bernsteinsäure [g]}}{\text{verbrauchte Menge Glycerin [g]}}$$

$Y_{P/S}$: Ertragskoeffizient [g/g]

$c_P^{t_2,1}$: Produktkonzentration zum Zeitpunkt t_2 bzw. t_1 [g/L]

$c_S^{t_2,1}$: Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_2 bzw. t_1 [g/L]

ΔP : gebildete Produktmenge

ΔS : verbrauchte Substratmenge

Da die Differenz im Nenner negativ ist, wird durch das negative Vorzeichen der gesamte Ausdruck positiv. Für die Produktion von Bernsteinsäure aus Glycerin ist ein theoretisch maximaler Ertragskoeffizient von 1,28 g/g möglich, das heißt, dass aus 1 g Glycerin 1,28 g Bernsteinsäure gebildet werden kann.

3.7.2 Produktivität

Die in dieser Arbeit berechnete Gesamtproduktivität beschreibt die Effizienz der Bernsteinsäureproduktion bezogen auf den Gesamtprozess. Dabei wird die Produktion als Rate ausgedrückt, d.h. der Quotient aus der Differenz von End- und Anfangskonzentration der Bernsteinsäure und der Kultivierungsdauer:

$$P_{\text{ges}} \quad [\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})] = \frac{c_{\text{end}}^{\text{BS}} - c_0^{\text{BS}}}{t}$$

P_{ges} : Gesamtproduktivität [g/(L·h)]
 $c_{\text{end}}^{\text{BS}}$: Endkonzentration der Bernsteinsäure [g/L]
 c_0^{BS} : Anfangskonzentration der Bernsteinsäure [g/L]
 t : Kultivierungsdauer [h]

Zusätzlich wurde die maximale Produktivität P_{max} berechnet. Sie gibt die maximale Bernsteinsäurekonzentration pro Zeiteinheit zwischen zwei Messpunkten an:

$$P_{\text{max}} \quad [\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})] = \frac{c_{t_2}^{\text{BS}} - c_{t_1}^{\text{BS}}}{t_2 - t_1}$$

P_{max} : maximale Produktivität [g/(L·h)]
 $c_{t_{1,2}}^{\text{BS}}$: Bernsteinsäurekonzentration zum Kultivierungszeitpunkt t_2 bzw. t_1 [g/L]
 $t_{1,2}$: Kultivierungszeitpunkt t_2 bzw. t_1 [h]

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Isolierung des Actinobacteria-Isolats aus der Mischkultur DSM 32268

Das aus einem Screening am Thünen-Institut hervorgegangene Actinobacteria-Isolat wurde durch das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH (HZI) einer neuen Gattung und Art innerhalb der Actinomyceten zugeordnet. Der Stamm wurde durch die DSMZ unter der Nummer DSM 32268 sicherheitshinterlegt und dem Thünen-Institut zur Bearbeitung als gefriergetrockneter Stamm zugesandt. Zur Reaktivierung wurde das Lyophilisat der Mischkultur DSM 32268 in Standardproduktionsmedium gegeben. Abbildung 10 zeigt die mikroskopische Aufnahme der ersten Inkulturnahme des Stammes.

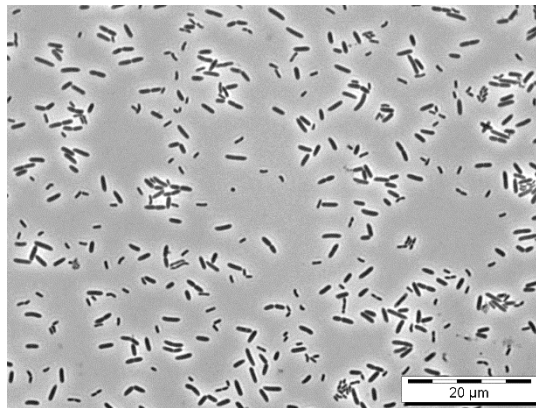


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 in Standardproduktionsmedium, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Zusätzlich wurde die Kultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen und mikroskopisch untersucht (Abbildung 11).

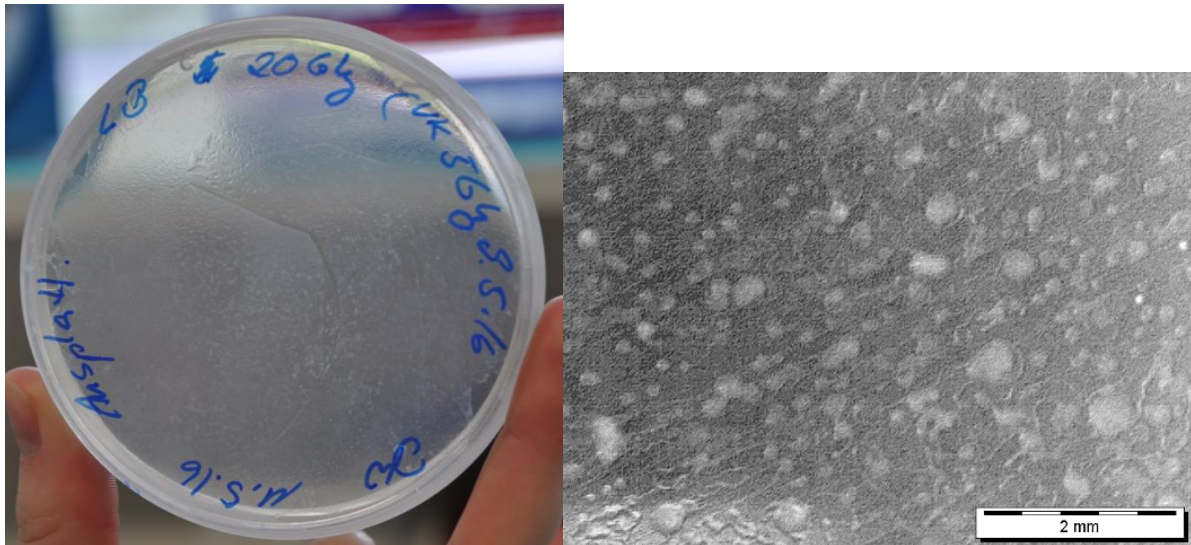


Abbildung 11: Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf LB-Agarplatten (links), stereomikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf LB-Agarplatten (rechts)

Makroskopisch waren auf festem Nährmedium zarte durchscheinende kaum sichtbare Kolonien erkennbar (Abbildung 11 links und rechts). Die Kolonien unterschieden sich voneinander in Größe, Form und Pigmentierung. Meist verliefen sie ineinander, dennoch wurden auch kleine abgegrenzte Kolonien detektiert. Sie erschienen von hell durchsichtig bis leicht gelblich.

Mikroskopisch betrachtet veränderte sich der Stamm je nach Stadium und Medienbedingung. Auf einer Nährplatte mit LB-Medium, versetzt mit 100 g/L Glycerin, lagerten sich die Zellen als Agglomerate zusammen. Die Zellen erreichten eine Länge von etwa 3 μm , es traten aber auch lange Zellfäden mit einer Länge von bis zu 20 μm auf (Abbildung 12).

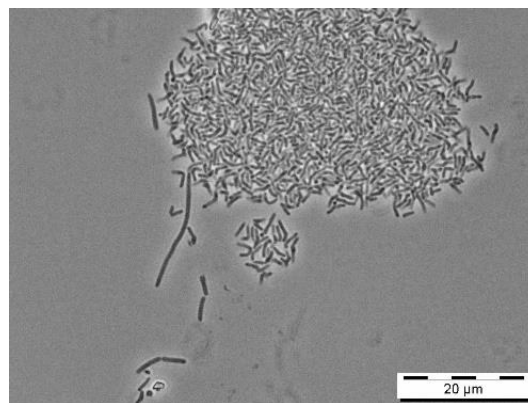


Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf einer Nährplatte (LB-Medium mit 100 g/L Glycerin), Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Während einer Kultivierung in Standardproduktionsmedium erschienen die Zellen dagegen zunächst einzeln als Stäbchen mit einer Länge von 2 - 3 μm (Abbildung 10), die sich während der Produktion auf Glycerin zu kleinen kokkenförmigen Zellen mit einer Länge von circa 1,5 μm veränderten (Abbildung 13). Eine Verkleinerung der Zellen deutete zumeist daraufhin, dass

die Zellen sich in der Produktionsphase befanden. Durch diese morphologische Änderung war eine Messung der Optischen Dichte (OD_{605nm}) zwar möglich, und zwischen den unterschiedlichen Experimenten aussagekräftig, aber mit OD_{605nm} -Werten aus Kultivierungen mit anderen Mikroorganismen nicht vergleichbar.

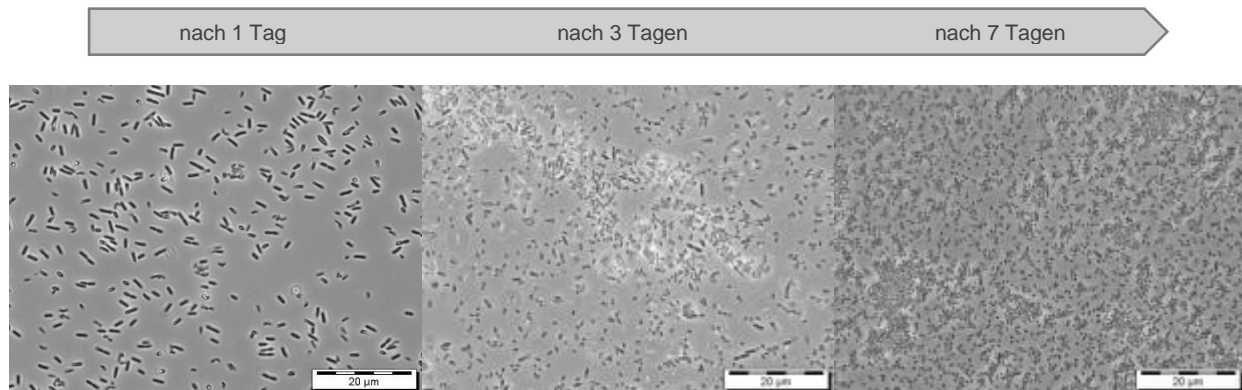


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 während der Produktion auf Glycerin, Veränderung der Morphologie von Stäbchen zu kokkenförmigen Zellen, Zeiss Axioplan, Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Aufgrund der vielseitigen Morphologie der Mischkultur wurden zahlreiche zeitintensive, vor allem auch mikroskopische, Untersuchungen durchgeführt. Die morphologische Vielfalt erschwerte Aussagen über die Reinheit des Actinobacteria-Isolates.

4.1.1 Taxonomische Charakterisierung des Bernsteinsäureproduzenten

Die taxonomische Einordnung des Actinobacteria-Isolates sowie die genetische Charakterisierung (Totalsequenzierung) wurde an Herrn Prof. Wink vom HZI in Braunschweig vergeben. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst. Die ersten Kulturen wurden auf selektiven Nährmedien für Actinomyceten (ISP-Medien nach ⁷²) durchgeführt. Aus dieser Kultur wurde die DNA extrahiert. Mittels PCR wurde das 16S-rRNA-Gen mit selektiven Primern amplifiziert. Diese Amplikons wurden anschließend sequenziert. Als Produktionsstamm wurde ein Stamm der Klasse Actinobacteria identifiziert, der zum nächsten Typstamm *Actinomyces natures* eine Homologie von nur 94 % aufwies. Diese geringe Ähnlichkeit zum nächsten valide beschriebenen Typstamm, bei einer Abdeckung von 97 % der 16S rRNA, legte die Vermutung nahe, dass es sich nicht nur um eine neue Spezies, sondern um eine neue Gattung handelte. Nach der Konservierung konnte diese Kultur jedoch nicht mehr reaktiviert werden. Die daraufhin von der DSMZ erhaltene Kultur DSM 32268 stellte sich als Mischkultur heraus, die ein schnell versporendes, aerobes Bakterium enthielt. Bei allen weiteren Kultivierungen setzte sich dieser Stamm immer wieder durch und ließ sich nicht mehr von dem Actinobacteria-Isolat trennen, obwohl nach längerer Inkubationszeit der zweite Kolonietypus beobachtet werden konnte. Unter diesen Kolonien befanden sich beständig Sporen des *Paenibacillus*-Stammes, die bei einer neuen Kultivierung sofort das Actinobacteria-Isolat überwucherten. Der

sporenbildende Stamm wurde der Spezies *Paenibacillus lautus* zugeordnet, wie die Analyse der 16S rRNA ergab.

Infolgedessen wurde die Reinkultur DSM 13411 des Stammes *Paenibacillus lautus* von der DSMZ angefordert, um dessen Anforderungen während der Bernsteinsäureproduktion im Vergleich zum Actinobacteria-Isolat herauszustellen.

Der bei der DSMZ unter der Nummer 32268 gelagerte Stamm wurde fortan als eine stabile Mischkultur aus mindestens 2 Stämmen bezeichnet, bei denen es sich um eine neuartige Gattung der Klasse Actinobacteria und der Spezies *Paenibacillus lautus* handelte.

4.1.2 Darstellung der Mischkultur DSM 32268 im Vergleich zum Stamm *Paenibacillus lautus* DSM 13411

Die Mikroorganismen *P. lautus* (DSM 13411) und die Mischkultur DSM 32268 wurden auf Nährplatten mit LB-Medium ausgestrichen, über 3 Tage bei 32 °C inkubiert und anschließend fotografisch untersucht (Abbildung 14 und Abbildung 15).

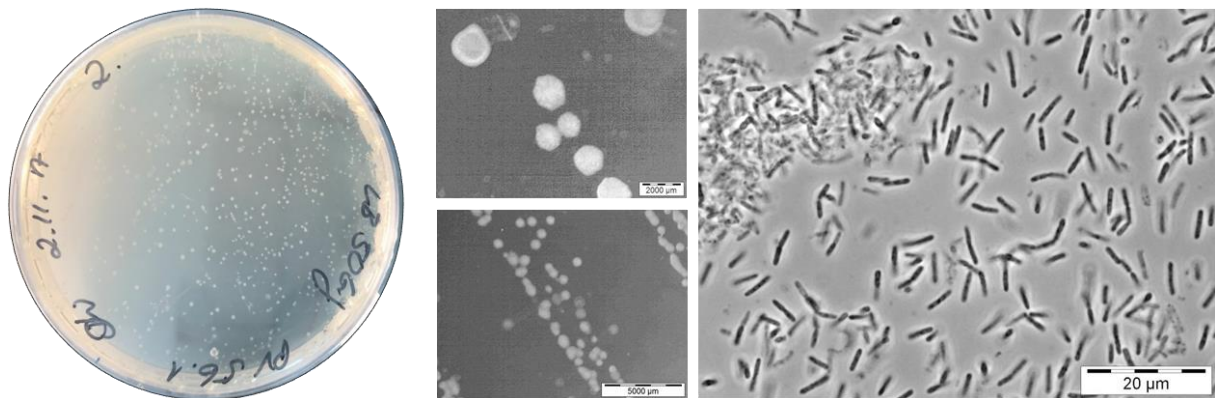


Abbildung 14: *P. lautus* DSM 13411 auf einer LB-Agarplatte mit 50 g/L Glycerin, links: Photographie der Agarplatte, mitte: stereomikroskopische Aufnahme der Kolonien auf der Agarplatte, rechts: mikroskopische Aufnahme des Stammes DSM 13411, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Die Zellen von *P. lautus* erschienen als abgegrenzte weiße Kolonien (Abbildung 14). Die Kolonien verteilten sich gleichmäßig über die Platte und waren im Durchmesser von ungefähr gleicher Größe (1000 µm - 2000 µm). Mikroskopisch betrachtet, trat der Stamm *Paenibacillus* als Stäbchen mit einer Länge von 10 µm auf, die sich etwas durchscheinend und leicht pigmentiert darstellten. Zumeist lagen die Stäbchen in Paaren vor.

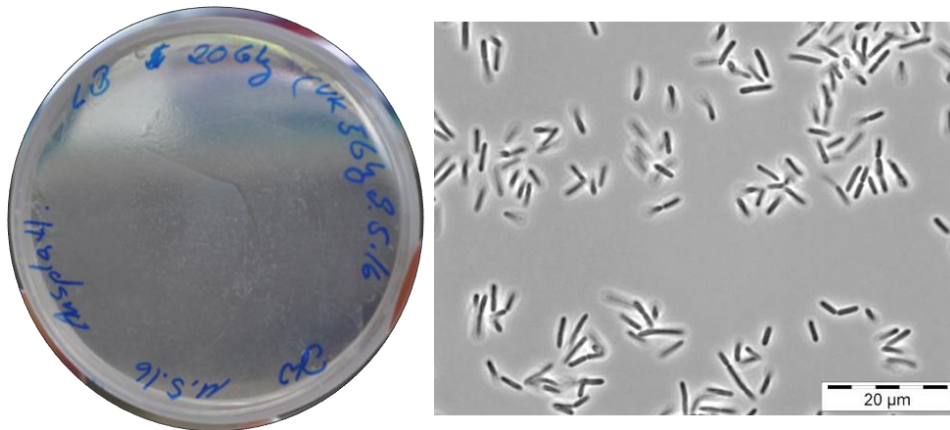


Abbildung 15: Mischkultur DSM 32268 auf einer LB-Agarplatte mit 20 g/L Glycerin, links: Fotografie der LB-Agarplatte, rechts: mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Die Mischkultur DSM 32268 dagegen erschien auf der Agarplatte als durchscheinende Kolonie (Abbildung 15). Die Stäbchen waren minimal kleiner als die der *Paenibacillus*-Spezies, jedoch nicht pigmentiert, etwas gleichmäßiger und an den Enden weniger abgerundet.

Nach mehrtägiger Inkubation der Mikroorganismen auf Nutrient Agarplatten (Abbildung 16 und Abbildung 17), waren deutliche Unterschiede in der Morphologie auszumachen. Der Stamm *P. lautus* DSM 13411 zeigte durchscheinende Zellen, die nahezu vollständig lysiert zu sein schienen, dennoch beweglich waren. Zudem lagen Konstrukte mit Verdickungen in der Mitte der Zelle sowie pinselartige, sporenbildende Zellen und Sporen vor.

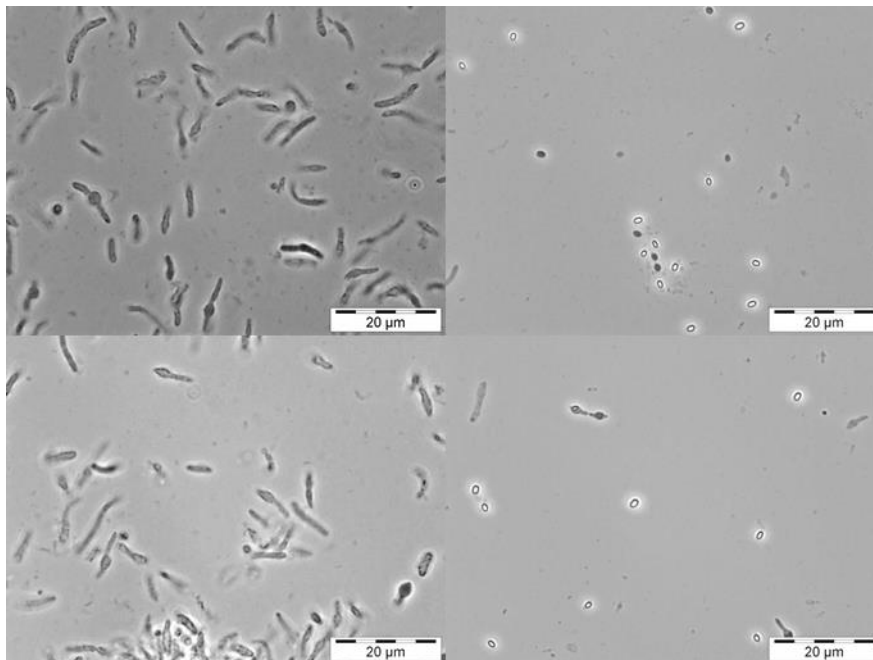


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahme des Stammes *P. lautus* DSM 13411 auf einer Nutrient Agarplatte, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Die Mischkultur DSM 32268 (Abbildung 17) dagegen war deutlich kleiner und bildete unbewegliche Stäbchen. Es wurden ebenfalls sporenbildende Zellen und Sporen gefunden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit dem *Paenibacillus* entstammten.

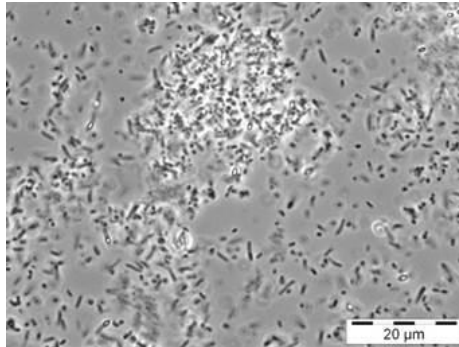


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf Nutrient Agarplatte, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Ferner wurden Kultivierungen mit beiden Spezies auf Standardproduktionsmedium mit je 50 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat durchgeführt, sodass die Produktspektren aufgenommen wurden und die Zellen zudem nochmals mikroskopisch (Abbildung 18) betrachtet werden konnten.

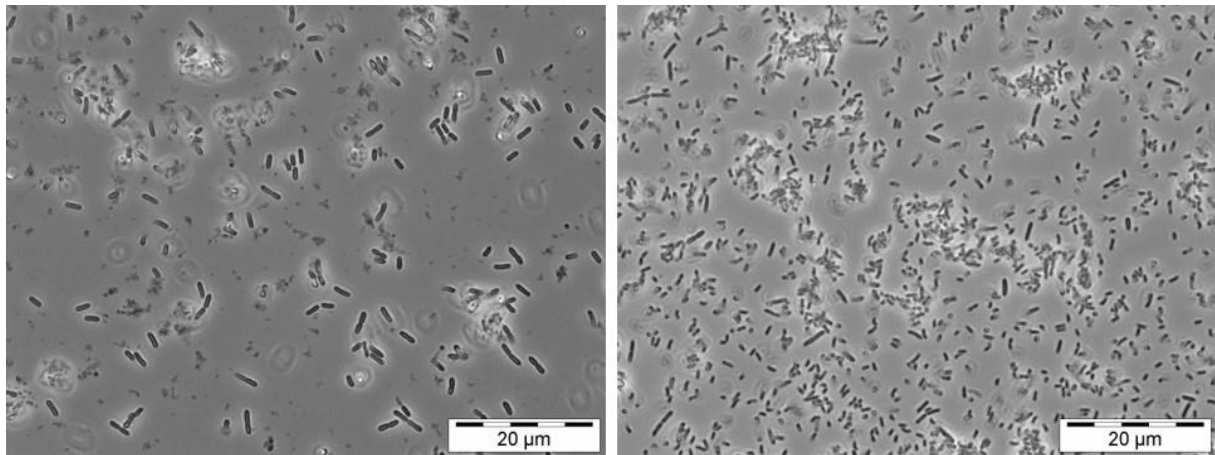


Abbildung 18: *P. lautus* DSM 13411 (links) und Mischkultur DSM 32268 (rechts) auf Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Während der Kultivierung auf dem Standardproduktionsmedium in Laborflaschen wurden hinsichtlich der Zellform und Zellgröße der vorliegenden Stämme geringe Unterschiede ausgemacht. Die Zellen des *P. lautus* DSM 13411 erscheinen an den Enden runder als die der Mischkultur. Nach 4-tägiger Kultivierungsdauer wurde zudem eine geringere Zelldichte bei der Reinkultur des *P. lautus* ausgemacht. Des Weiteren wurden bei der Mischkultur DSM 32268 wesentlich kleinere Zellen mit einer Länge von maximal 1 µm detektiert. Deutliche Unterschiede wurden jedoch hinsichtlich der Produktspektren festgestellt (Abbildung 19).

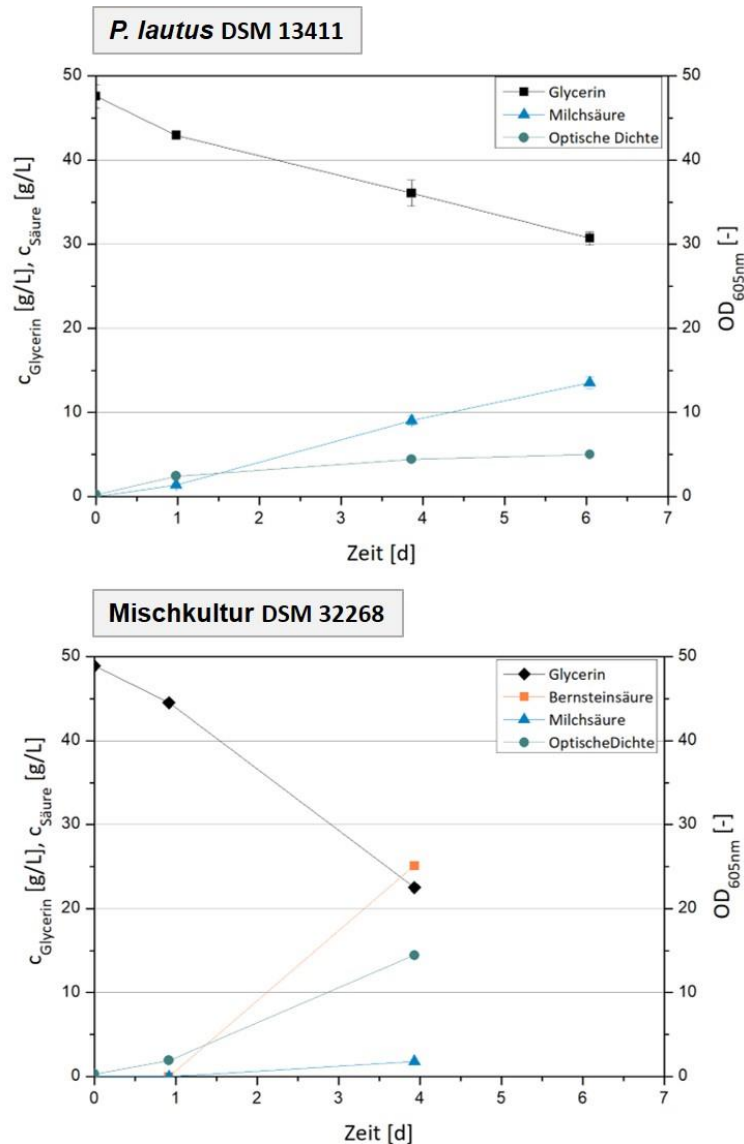


Abbildung 19: Produktspektren von *P. lautus* DSM 13411 (oben) und der Mischkultur DSM 32268 (unten) auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L); Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL

Der Stamm *P. lautus* DSM 13411 bildete über eine Kultivierungsdauer von 6 Tagen lediglich $13,5 \pm 0,69$ g/L Milchsäure. Dabei wurden etwa $30,7 \pm 0,78$ g/L Glycerin nicht verwertet. Die Optische Dichte stieg in dieser Zeit auf maximal $\text{OD}_{605\text{nm}}$ $5 \pm 0,15$ an.

Im Produktspektrum der Mischkultur DSM 32268 wurde nach 4 Tagen Kultivierungsdauer Bernsteinsäure als Hauptprodukt mit einer Konzentration von 25,1 g/L detektiert. Als Nebenprodukt entstand einzig Milchsäure mit einer Menge von 1,8 g/L. Die Optische Dichte stieg innerhalb von 4 Tagen auf $\text{OD}_{605\text{nm}}$ 14,5 an. In der Summe wurden während der Kultivierung auf Standardproduktionsmedium deutliche Unterschiede zwischen der Mischkultur und der *Paenibacillus*-Spezies festgestellt. Der Stamm *P. lautus* DSM 13411 wuchs auf Glycerin nicht nur langsamer, sondern bildete als einziges Produkt Milchsäure.

Die bei der Mischkultur DSM 32268 produzierte Milchsäure könnte daher, zum Teil, auch aus dem Stoffwechselweg von *P. lautus* hervorgegangen sein. Da allerdings während der Kultivierung der Mischkultur DSM 32268 geringere Mengen Milchsäure gebildet wurden, als es der Fall bei der Reinkultur von *P. lautus* DSM 13411 war, konnte die Vermutung angestellt werden, dass das unbekannte Actinobacteria-Isolat in der Mischkultur die *Paenibacillus*-Spezies an der Produktion von Milchsäure hinderte oder sogar in der Lage war, die gebildete Milchsäure wieder zu verwerten.

Aufbauend auf den Unterschieden der Bakterienstämme beabsichtigten die weiteren Versuchsreihen die Isolierung des unbekannten Actinobacteria-Isolates aus der Mischkultur DSM 32268.

4.1.3 Überprüfung der Fähigkeit zur Verwertung von Milchsäure

Ein möglicher Ansatz zur Isolierung des unbekannten Actinobacteria-Isolates aus der Mischkultur DSM 32268 erfolgte über die Überprüfung zur Verwertung von Milchsäure. Dazu wurden die Stämme *P. lautus* DSM 13411 und die Mischkultur DSM 32268 auf einen herkömmlichen Ansatz des Standardproduktionsmediums kultiviert. Auf Glycerin als Substrat wurde verzichtet, stattdessen wurde Milchsäure mit einer Konzentration von 5 g/L eingesetzt. Damit kein restliches Glycerin aus vorherigen Kultivierungen im Inokulum mitgezogen wurde, wurden ausgehungerte Zellen verwendet, das heißt eine Vorkultur auf Milchsäure wurde für die Inokulation benutzt.

Nach 6-tägiger Kultivierungsdauer war die eingesetzte Milchsäure von der Mischkultur DSM 32268 nahezu vollständig verwertet (0,4 g/L) und zu Bernstein- (0,12 g/L), Ameisen- (0,38 g/L) und Essigsäure (0,82 g/L) umgesetzt worden. Die Optische Dichte wuchs bis auf einen Wert von OD_{605nm} 5 an (hier nicht abgebildet).

Bereits beim ersten Anziehen des Stammes *P. lautus* DSM 13411 auf 5 g/L Milchsäure stellte sich heraus, dass dieser nicht in der Lage war Milchsäure zu verwerten. Die widrigen Kultivierungsbedingungen führten sogar zum Ausbilden von sporenbildenden Zellen. Ein marginales Wachstum der Reinkultur DSM 13411 auf OD_{605nm} 2 wurde trotz dessen verzeichnet, was nicht zuletzt am im Medium enthaltenen Hefeextrakt lag.

Eine Unterdrückung des Stammes *P. lautus* sollte auf diese Art und Weise zielführend sein. Die zuvor auf Milchsäure angezogene Kultur der Mischkultur DSM 32268 wurde nun auf Bernsteinsäurebildung in Standardproduktionsmedium mit Glycerin und Magnesiumcarbonat getestet (Abbildung 20).

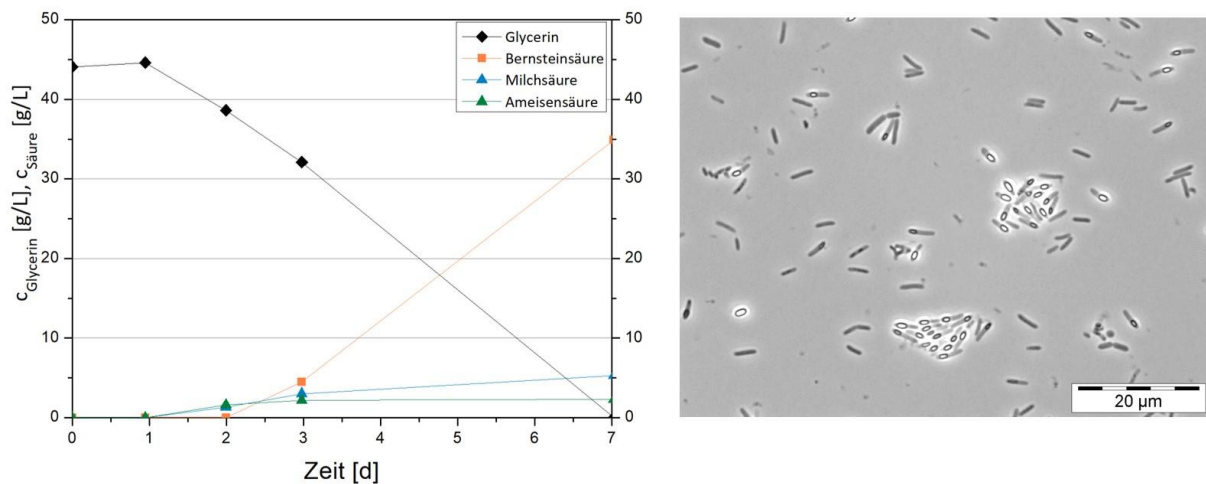


Abbildung 20: Kultivierungsverlauf (links) der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L) aus Milchsäure-Vorkultur; Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, mikroskopische Aufnahme (rechts) der Mischkultur DSM 32268 nach Beendigung der Kultivierung, ausgestrichen auf Nutrient Agarplatten, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Die Abbildung 20 (links) zeigt, dass die Mischkultur DSM 32268 auf 50 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat Bernsteinsäure mit einer Konzentration von 36 g/L, aber auch die Nebenprodukte Milchsäure (6 g/L) und Ameisensäure (2 g/L) produzierte. Die Kultursuspension wurde nach Beendigung der Kultivierung mittels Impfösendausstrich auf Nutrient Agarplatten aufgetragen, bei 32 °C über 3 Tage inkubiert und im Anschluss mikroskopisch betrachtet (Abbildung 20, rechts). Neben Stäbchen wurden erneut Sporen in geschwollenen Sporangien festgestellt, die darauf hindeuteten, dass der Stamm *P. lautus* auch mit dieser Methode nicht zu unterdrücken war. Der Stamm der *Paenibacillus*-Spezies war trotz widriger Kultivierungsbedingungen überlebensfähig und überdauerte möglicherweise in Sporen.

4.1.4 Kultivierung auf Actinomycete Isolation Agar

Ein für die Isolierung und Vermehrung von Actinomyceten selektives Medium wurde verwendet, um das unbekannte Actinobacteria-Isolat von der Mischkultur DSM 32268 trennen zu können. Die Mischkultur DSM 32268 und der Stamm *P. lautus* DSM 13411 wurden daher auf Actinomycete Isolation Agarplatten (AIA) ausgestrichen und bei 32 °C inkubiert.

Während bei der Mischkultur DSM 32268 zwei Kolonieförmungen herausgestellt wurden (Abbildung 21 oben), zeigte der Stamm *P. lautus* DSM 13411 (Abbildung 21 unten), wie erwartet, nur eine auf, da es sich hier um die von der DSMZ angeforderte Reinkultur handelte.

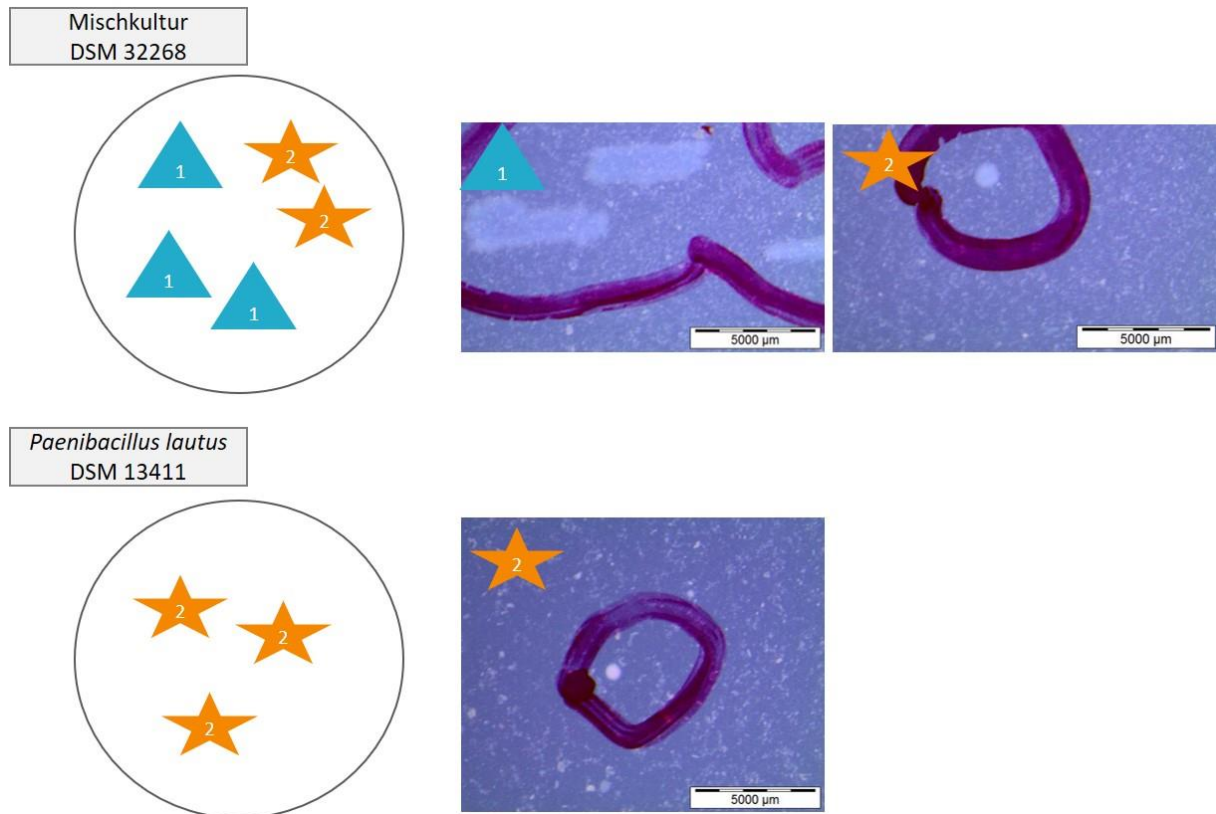


Abbildung 21: Schematische Darstellung (links) und stereomikroskopische Aufnahme (rechts) der Actinomycete Isolation Agarplatten der Mischkultur DSM 32268 (oben) mit zwei unterschiedlichen Kolonieformen und der Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411 (unten) mit nur einer Kolonieform

Kolonieform 1 auf der AIA-Platte der Mischkultur DSM 32268 deutete aufgrund der verlaufenen Form auf eine Spezies der Gattung *Actinomyces* hin^{66,67}. Die zweite Kolonieform auf dieser Platte ähnelte dagegen sehr jener, die auf der AIA-Platte der Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411 ausgebildet wurde. Die Kolonieformen wurden selektiv aufgenommen und auf Nutrient Agar beziehungsweise in Nutrient Broth überführt. Während nach wenigen Tagen zunächst Stäbchen und verzweigte Zellen mikroskopisch zu beobachten waren, veränderten sich die Zellen mit fortschreitender Kultivierungszeit zu Sporen und sporenbildenden Zellen (Abbildung 22). Ein identisches Bild wurde auch bei *Paenibacillus lautus* erhalten, neben Stäbchen wurden nach einigen Tagen ebenfalls Sporen ausgemacht (Abbildung 23).

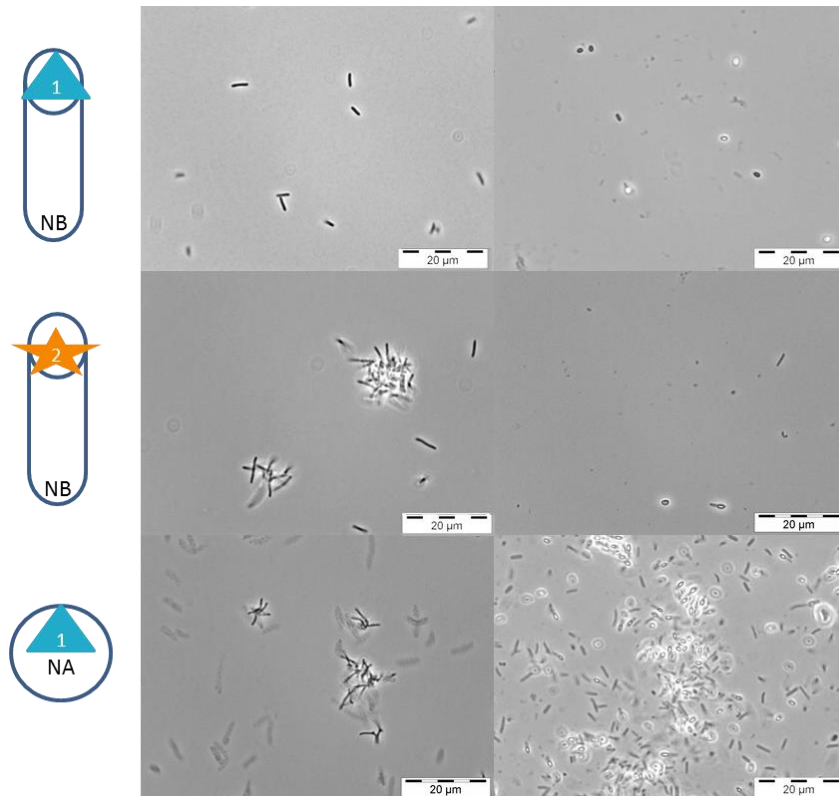


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahmen der Mischkultur DSM 32268 isoliert von einer AIA-Platte und anschließend auf NA-Platte und in NB-Medium kultiviert, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

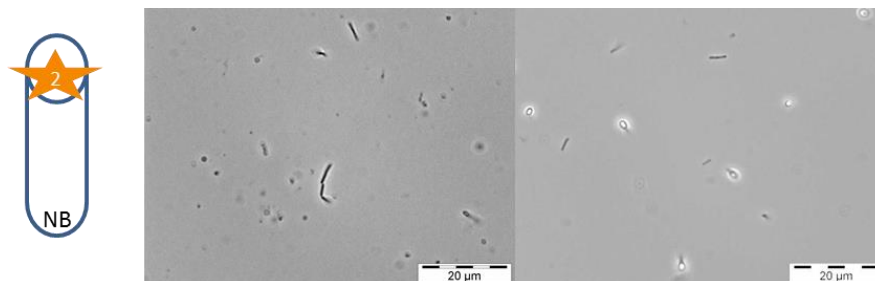


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen des *P. lautus* DSM 13411 isoliert von einer AIA-Platte und anschließend in NB-Medium kultiviert, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Im Weiteren wurde überprüft, ob die optisch unterschiedlichen Kolonieformen auf der AIA-Platte der Mischkultur DSM 32268 verschiedene Produktspektren hervorbrachten. Dazu wurden die Kulturen in Standardproduktionsmedium mit je 50 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat in Laborflaschen mit Septum und Kanüle kultiviert. In Abbildung 24 c ist die Kolonieform 2 und in d die Kolonieform 1 dargestellt.

Als Referenz wurden die Kultivierungsprofile der Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411 (Abbildung 24 a) sowie der Mischkultur DSM 32268 (Abbildung 24 b) aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

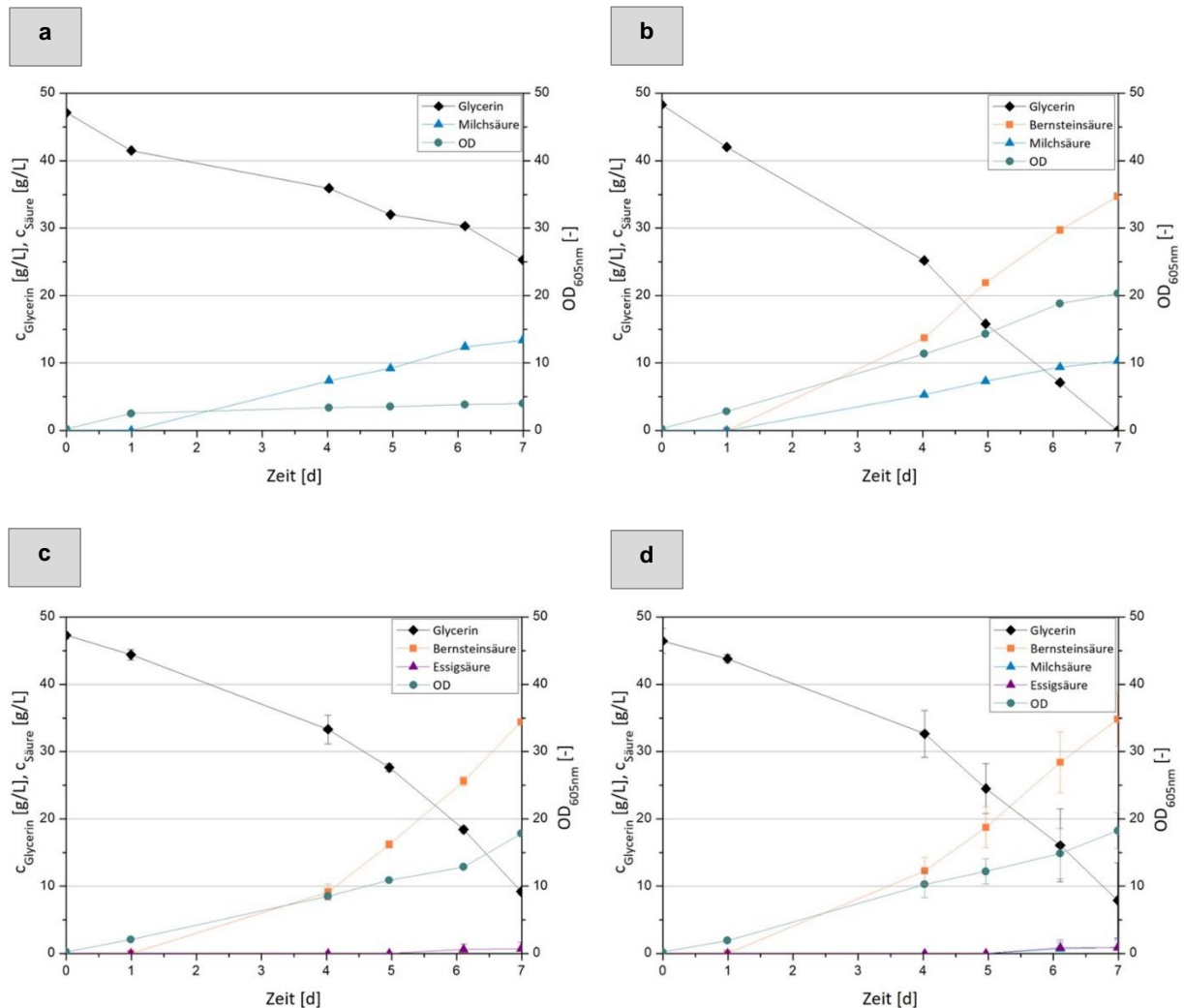


Abbildung 24: Produktspektren der Kultivierungen auf Standardproduktionsmedium (je 50 g/L Glycerin und MgCO_3) von a: *P. lautus* DSM 13411, b: Mischkultur DSM 32268, c: abgegrenzte Kolonie der Mischkultur DSM 32268, d: verlaufene Kolonie der Mischkultur DSM 32268; Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL

Das Produktspektrum von der Reinkultur *P. lautus* DSM 13411 unterschied sich deutlich von den anderen Kultivierungen, da hier keine Bernsteinsäure gebildet wurde, allerdings Milchsäure mit einer Konzentration von 13 g/L. Nach 7 Tagen Kultivierungszeit befanden sich noch 25 g/L Glycerin in der Bakteriensuspension. Zudem stieg die Optische Dichte auf einen Wert von nur $\text{OD}_{605\text{nm}}$ 4 an.

Indes brachte die Referenz-Kultivierung mit der Mischkultur DSM 32268 eine Bernsteinsäure- und Milchsäurekonzentration von 35 g/L und 10 g/L hervor. Das eingesetzte Glycerin wurde nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen komplett verwertet, die Optische Dichte stieg im Vergleich zu der des *P. lautus* DSM 13411 um das Fünffache an ($\text{OD}_{605\text{nm}}$ 20).

Die Produktspektren der beiden selektierten Kolonieformen ähnelten dem der Mischkultur DSM 32268. Die Optische Dichte erreichte bei beiden einen Wert von $\text{OD}_{605\text{nm}}$ 18. Die Kultivierung der abgegrenzten Kolonie (Kolonieform 2) brachte 34 g/L Bernsteinsäure und 0,7 g/L

Essigsäure hervor, wobei eine Rest-Glycerinmenge von 9 g/L nach 7 Tagen Kultivierungszeit zurückblieb, gleichermaßen wie bei der Kultivierung mit der verlaufenen Kolonie (Kolonieform 1). Bei dieser wurden 35 g/L Bernsteinsäure, 1 g/L Milchsäure und 1 g/L Essigsäure gebildet.

Folglich konnte herausgestellt werden, dass *P. lautus* DSM 13411 keine Bernsteinsäure bildete, aber für die Milchsäure im Produktspektrum der Mischkultur DSM 32268 verantwortlich sein könnte. Die verschiedenen Kolonieformen zeigten einen nahezu identischen Kultivierungsverlauf und glichen der Referenz der Mischkultur DSM 32268 stark. Dass kein Vollumsatz nach 7-tägiger Kultivierungsdauer erzielt wurde, ließ sich auf die unterschiedlichen Inokulumsherkünfte zurückführen. Bernsteinsäure stellte mit einer Konzentration von 35 g/L das Hauptprodukt dar, dagegen wurden nahezu keine Nebenprodukte generiert. Bei beiden Kolonieformen war davon auszugehen, dass es sich möglicherweise um das unbekannte Actinobacteria-Isolat handeln könnte, jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich die *Paenibacillus*-Spezies noch im Hintergrund befand, und somit für das unterschiedliche Aussehen der Kolonien verantwortlich war.

4.1.5 Ermittlung des Sauerstoffbedarfs mittels Thioglykolat-Test

Mikroorganismen können hinsichtlich ihres Sauerstoffbedarfs und ihrer physiologischen Fähigkeiten identifiziert oder zumindest einer physiologischen Gruppe zugeordnet werden. Hintergrund dieses Ansatzes war es, dass eine unterschiedliche Ausbildung der Wachstumszonen durch den Thioglykolat-Test herbeigeführt werden kann. Während das Actinobacteria-Isolat in der Mischkultur DSM 32268 als mikroaerophil beschrieben wird, ist *Paenibacillus lautus* ein fakultativ anaerober Organismus. Zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs wurde Thioglykolat-Nährmedium (3.3.6) in Reagenzgläser mit Schraubdeckel verwendet. Dem halbflüssigen Nähragar wurden 100 µL Bakteriensuspension zugesetzt und bei 32 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. Als Referenz diente eine Nullprobe ohne Inokulat.

Die Anlagerung der Wachstumszonen der Mischkultur DSM 32268 und der Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411 ist in Abbildung 25 dargestellt.

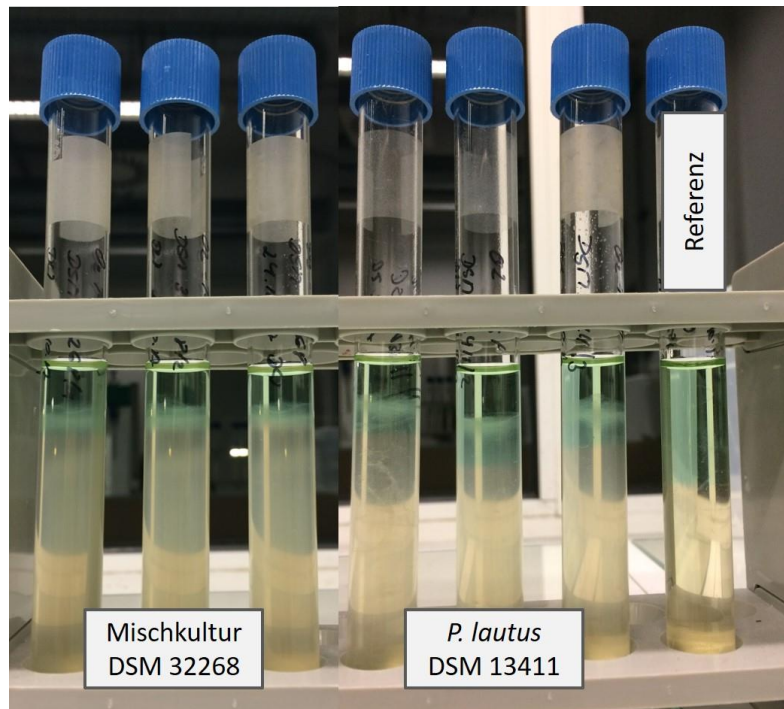


Abbildung 25: Thioglykolat-Test zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs der Mischkultur DSM 32268 und von *P. lautus* DSM 13411

Während die Referenz, wie erwartet, ohne Ausbildung einer Wachstumszone blieb, zeigten sich bei der Mischkultur DSM 32268, wie auch bei der Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411, ein identischer Bereich, in dem sich die Mikroorganismen anlagerten. Die türkis-blaue Phase stellt den aeroben Bereich im Reagenzröhrchen dar, der beige-durchsichtige Bereich ist dagegen anaerob. Mikroaerophile Organismen lagern sich etwas unterhalb der Oberfläche in einer Zone geringerer Sauerstoffkonzentration an. Somit konnte mit diesem Versuch zwar die Mikroaerophilie nachgewiesen, allerdings keine Unterscheidung zwischen des in der Mischkultur vorhandenen Actinobacteria-Isolates und der Reinkultur *P. lautus* herausgestellt werden.

Vermutet wurde, dass die Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411, welches die Nähragarplatten bei aeroben Bedingungen innerhalb von 2 Tagen nahezu vollständig überwuchs, sich bei diesem Test in der aeroben Phase anlagern würde, das Actinobacteria-Isolat aus der Mischkultur DSM 32268 dagegen im mikroaerophilen Bereich. Vermutlich schuf *P. lautus* aber ein für das unbekannte Actinobacteria-Isolat optimales Milieu, wodurch sich keine getrennten Mikroorganismen-Bänder zeigten, sondern beide Stämme im Verbund auftraten. Eine Trennung und anschließende Isolierung waren damit nicht möglich. Allerdings konnte aufgezeigt werden, dass das Actinobacteria-Isolat mikroaerophile Bedingungen für das Wachstum, und möglicherweise auch für die Produktion von Bernsteinsäure, bevorzugte.

Zusammenfassend wurde herausgestellt, dass es sich bei der vorliegenden Bakterienkultur DSM 32268 um eine stabile Mischkultur handelt. Die darin vorhandenen Mikroorganismen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht trennbar. Es wurde vermutet, dass diese in einer Symbiose leben und mit beidseitigem Vorteil, bezüglich biologischer Fitness, Überlebenswahrscheinlichkeit oder verbessertem Stoffwechsel, verbunden sind. Möglicherweise bot die *Paenibacillus*-Spezies optimale Verhältnisse hinsichtlich der Sauerstoffmenge im Medium an, denn das unbekannte Actinobacteria-Isolat in der Mischkultur DSM 32268 produzierte unter den gegebenen Bedingungen bereits in größeren Mengen Bernsteinsäure als Hauptprodukt. Im Weiteren sollte daher untersucht werden, inwiefern die Produktion durch Anpassung verschiedener Parameter beeinflusst werden konnte, um folglich einen wirtschaftlich effizienten Prozess für die Bernsteinsäurebildung zu etablieren.

4.2 Optimierung des Produktionsprozesses der Mischkultur DSM 32268

4.2.1 Etablierung einer Zwischenkultur

Um die Reproduzierbarkeit des Prozesses zur Herstellung von Bernsteinsäure zu gewährleisten, wurde als Zwischenschritt eine Zwischenkultur etabliert. Diese fungierte zwischen der Vorkultur, die zur Vermehrung der Zellen diente und der Hauptkultur, die für die Produktion eingesetzt wurde. Durch das Überimpfen wurden reproduzierbare Kultivierungsbedingungen geschaffen. Die während einer stabilen Vorkultur generierten vitalen Zellen dienten als Inokulum für eine Zwischenkultur. Eine weitere Vermehrung generierte ausreichend Zellmasse, die anschließend für die Produktion von Bernsteinsäure in der Hauptkultur benötigt wurde. Die Vorgehensweise ausgehend von einer Kryokultur bis zur Hauptkultur ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.



Abbildung 26: Inokulationsstrategie zur Etablierung einer Zwischenkultur ausgehend von einer Kryokultur bis zu einer Hauptkultur

Abbildung 26 zeigt, dass aus einem bei -80 °C gelagerten Kryo 1 mL (2 %) Zellsuspension als Inokulum für eine Vorkultur verwendet wurde. Diese Vorkultur wurde ebenso wie die Zwischen- und Hauptkultur in 100 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle sowie einem Arbeitsvolumen

von 50 mL durchgeführt. Die eingesetzte Glycerin- und Magnesiumcarbonatkonzentration betrug für die Vorkultur 30 g/L, für die Zwischenkultur 50 g/L und wenn nicht anders beschrieben für die Hauptkultur 100 g/L. Nach einer Kultivierungsdauer von 3 Tagen bei 32 °C und 150 rpm wurde die Vorkultur beendet und die Kultursuspension bei 4 °C für die weitere Verwendung gelagert oder direkt als Inokulum für eine Zwischenkultur verwendet. Hierbei wurde die gleiche Herangehensweise wie bei der Vorkultur angewendet. In Abbildung 27 ist der Verlauf einer Zwischenkultur der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium dargestellt.

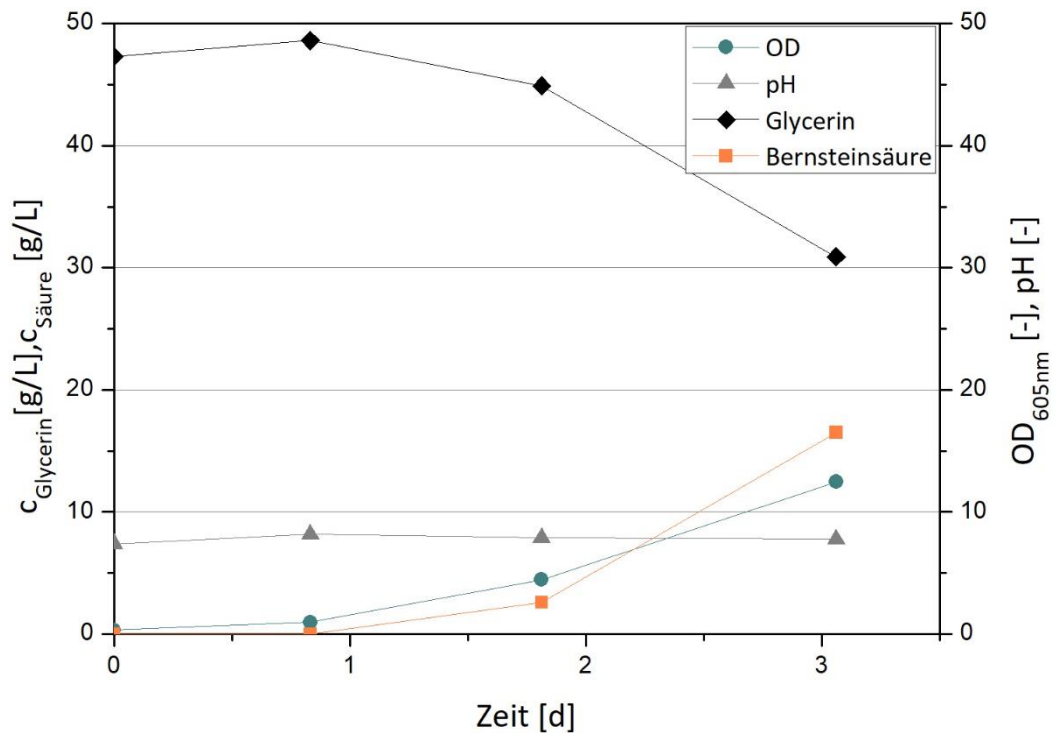


Abbildung 27: Kultivierungsverlauf einer Zwischenkultur der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und $MgCO_3$ (50 g/L); Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL

Die Kultivierung wurde für 3 Tage durchgeführt. Dabei wurde das eingesetzte Glycerin zu Bernsteinsäure mit einer Konzentration von 16,5 g/L und Biomasse (OD_{605} 12,5) umgesetzt. Während des ersten Tages der Kultivierung war eine Anpassung der Mischkultur DSM 32268 an das vorherrschende Milieu zu erkennen. Anschließend wurde Glycerin für das Wachstum und die Produktion verstoffwechselt. Die Bildung von Nebenprodukten war in dieser Phase noch nicht zu beobachten. Die wachstumsgekoppelte Produktion von Bernsteinsäure ist auch an der Morphologie der Zellen deutlich zu erkennen (Abbildung 28). Während nach 2 Tagen der Kultivierung vorrangig Stäbchen mit einer Länge von 4 μm vorherrschten, verkleinerten sich die Zellen mit steigender Bernsteinsäurekonzentration und Biomasse zu kokkoiden Zellformen mit einer Länge von 1 bis 1,5 μm .

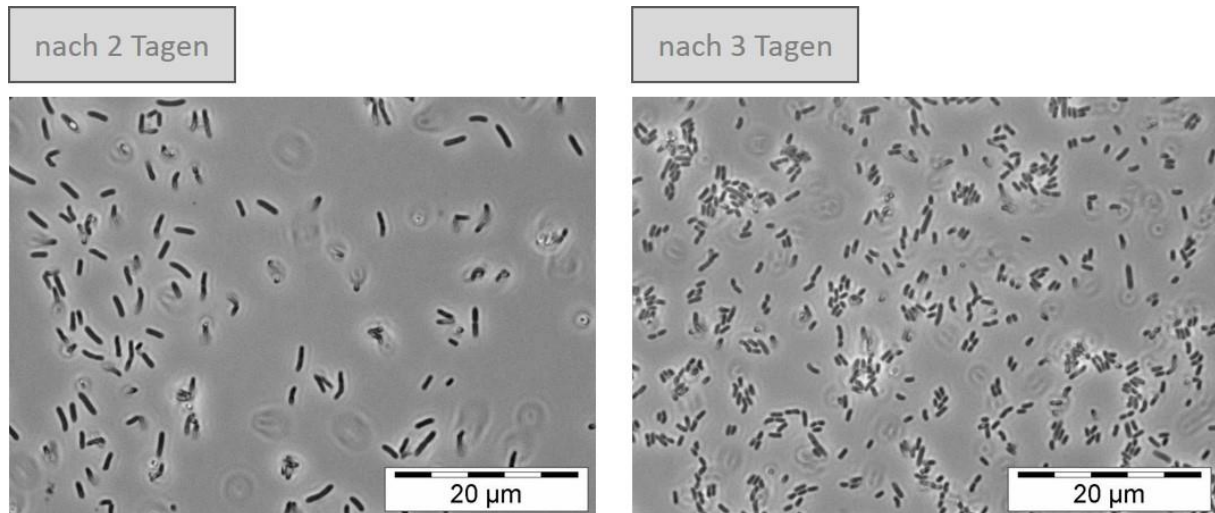


Abbildung 28: Morphologie der wachstumsgekoppelten Produktion der Mischkultur DSM 32268 während einer Zwischenkultur auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L), Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Die Zwischenkultur diente im Weiteren als Inokulum für eine Hauptkultur. Durch Lagerung der Zwischenkultur bei 4 °C stand für jeden Kultivierungsversuch dasselbe Inokulum zur Verfügung. Der schematische Verlauf einer Hauptkultur zur Produktion von Bernsteinsäure mit der Mischkultur DSM 32268 ist in Abbildung 29 dargestellt.

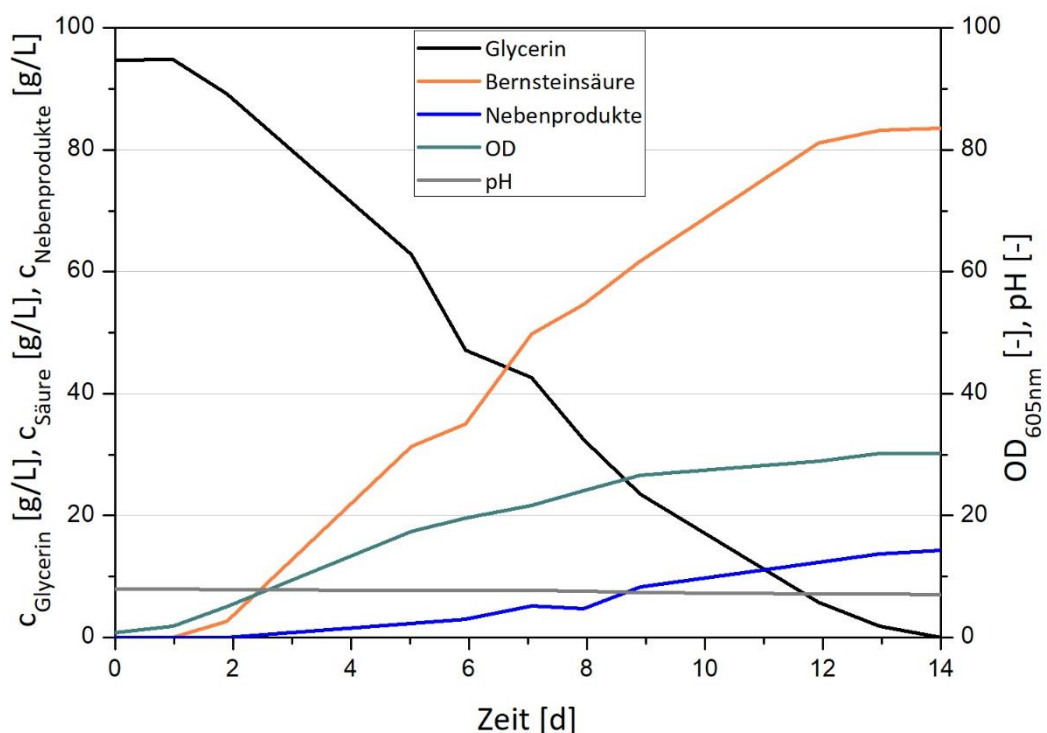


Abbildung 29: Schematischer Kultivierungsverlauf einer Hauptkultur der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (100 g/L); Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL

Der 14-tägige Kultivierungsverlauf zeigt, dass die Mischkultur DSM 32268 etwa einen Tag benötigte, um sich an die vorherrschenden Bedingungen anzupassen. Das eingesetzte Glycerin wurde erst anschließend verwertet und zur Bildung von Bernsteinsäure, Nebenprodukten und Zellmasse eingesetzt. Nach etwa 12 Tagen Kultivierungsdauer flachte die bis dahin nahezu lineare Bildung von Bernsteinsäure ab, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch eine Rest-Glycerinkonzentration von etwa 10 g/L vorlag. Möglicherweise waren aber die im Medium vorhandenen Komplexbestandteile, wie Hefeextrakt und Trypton/Pepton, aufgebraucht. Die Optische Dichte erreichte am Ende der Kultivierung einen Wert von etwa OD_{605nm} 30. Der Verlauf glich dem der Bernsteinsäurebildung. Aufgrund dessen konnte geschlussfolgert werden, dass die Produktkonversion für die Mischkultur DSM 32268 wachstumsgekoppelt verlief. Der pH-Wert wurde während des gesamten Kultivierungsprozesses im Bereich pH 7-8 durch das verwendete $MgCO_3$ gepuffert und ermöglichte der Mischkultur DSM 32268 effizient Bernsteinsäure herzustellen. Die Nebenprodukte resultierten nach 14-tägiger Kultivierungsdauer in einer Konzentration von etwa 14 g/L. Zusätzlich wurde eine Korrelation hinsichtlich der Optischen Dichte und der Biotrockenmasse hergestellt (Abbildung 30).

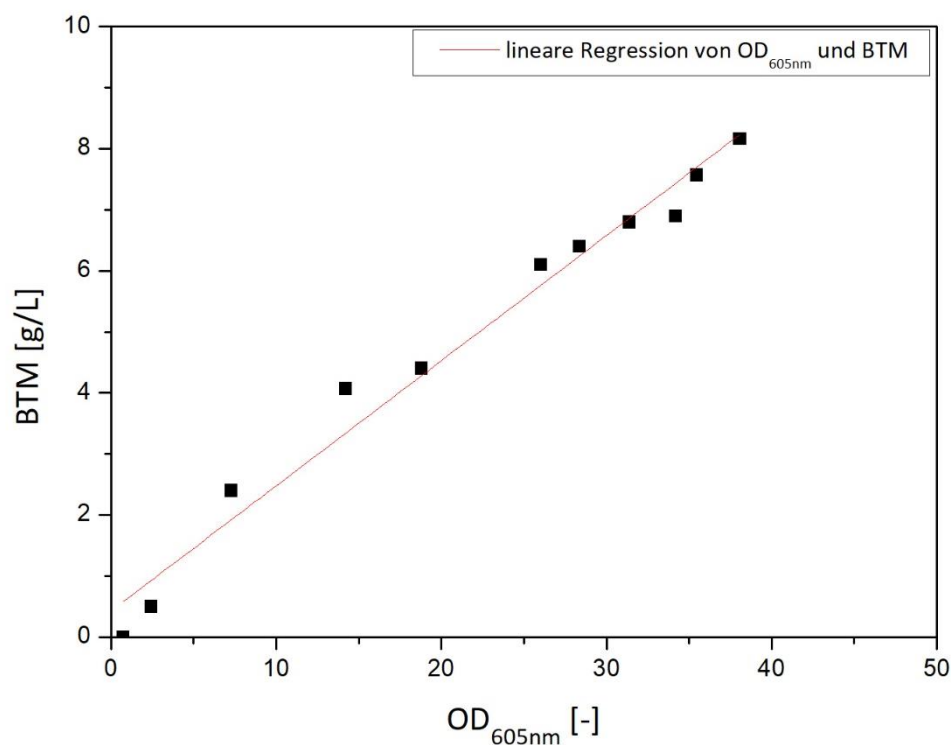


Abbildung 30: Korrelation von Optischer Dichte (OD_{605nm}) und Biotrockenmasse (BTM) während einer Kultivierung auf Standardproduktionsmedium auf Glycerin und $MgCO_3$ (100 g/L) für die Mischkultur DSM 32268, Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL

Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression wies einen Wert von 0,976 auf. Die Variation von etwa 2 % kann damit erklärt werden, dass zur Bestimmung der Biotrockenmasse das

während der Kultivierung eingesetzte MgCO_3 mit 1M Salzsäure aufgelöst werden musste, um die Biomasse von der Kulturbrühe mittels Zentrifugation abtrennen zu können. Für die Steigung der Korrelation wurde ein Wert von 0,205 erhalten, was bedeutet, dass eine $\text{OD}_{605\text{nm}}$ -Einheit 0,205 g/L Biotrockenmasse entspricht.

4.2.2 Wahl eines geeigneten Kultivierungssystems für die Mischkultur DSM 32268

Die in der Mischkultur vorhandene *Paenibacillus*-Spezies wurde unter den herkömmlichen Produktionsbedingungen von dem Actinobacteria-Isolat in der Mischkultur DSM 32268 überwachsen. Zu Beginn einer Kultivierung wurde vermutlich durch *P. lautus* ein für das Actinobacteria-Isolat entsprechendes Milieu bereitgestellt, sodass eine Überproduktion von Bernsteinsäure ermöglicht wurde. Die Ausbildung von Sporen durch *P. lautus* wurde während der Bernsteinsäurebildung unterbunden.

Mit Hilfe des Thioglykolat-Tests wurde herausgestellt, dass die Mischkultur DSM 32268 mikroaerophile Bedingungen bevorzugt. Davon ausgehend wurde ein Kultivierungssystem gesucht, bei dem die Kultur Bernsteinsäure im Überschuss produzierte. Von einer aeroben Kultivierung in Schüttelkolben wurde abgesehen, da Tests zeigten, dass zwar die Verwertung von Glycerin möglich war, als Produkte aber vor allem Milchsäure und Essigsäure hervorgebracht wurden. Die Bildung von Bernsteinsäure blieb dagegen nahezu aus. Die sauerstoffreichen Bedingungen bevorzugten daher in der Mischkultur DSM 32268 den Stamm *P. lautus*. Als mögliche Kultivierungssysteme wurden Laborflaschen mit Deckel sowie Serumflaschen jeweils mit einem Volumen von 100 mL untersucht. Der Deckel der Laborflaschen wurde zum einen geschlossen belassen, zum anderen mit einem Silikonkautschukseptum ausgestattet, die Serumflaschen dagegen mit einem Butylstopfen. Eine minimale Belüftung des Kopfraums der Flaschen erfolgte durch eine im Septum bzw. Stopfen eingeführte Kanüle (\varnothing 16 x 25 mm). Das Arbeitsvolumen in den Flaschen betrug je 50 mL. Es wurden jeweils drei parallele Ansätze der genannten Kultivierungssysteme angesetzt und deren Mittelwert und Standardabweichung für die Produkte und Nebenprodukte nach 14 Tagen Kultivierungsdauer ermittelt (Abbildung 31). Als Medium diente Standardproduktionsmedium mit einer Glycerin- und Magnesiumcarbonatkonzentration von 100 g/L, die Kultivierungsparameter Temperatur und Schüttelfrequenz wurden auf 32 °C und 150 rpm gesetzt.

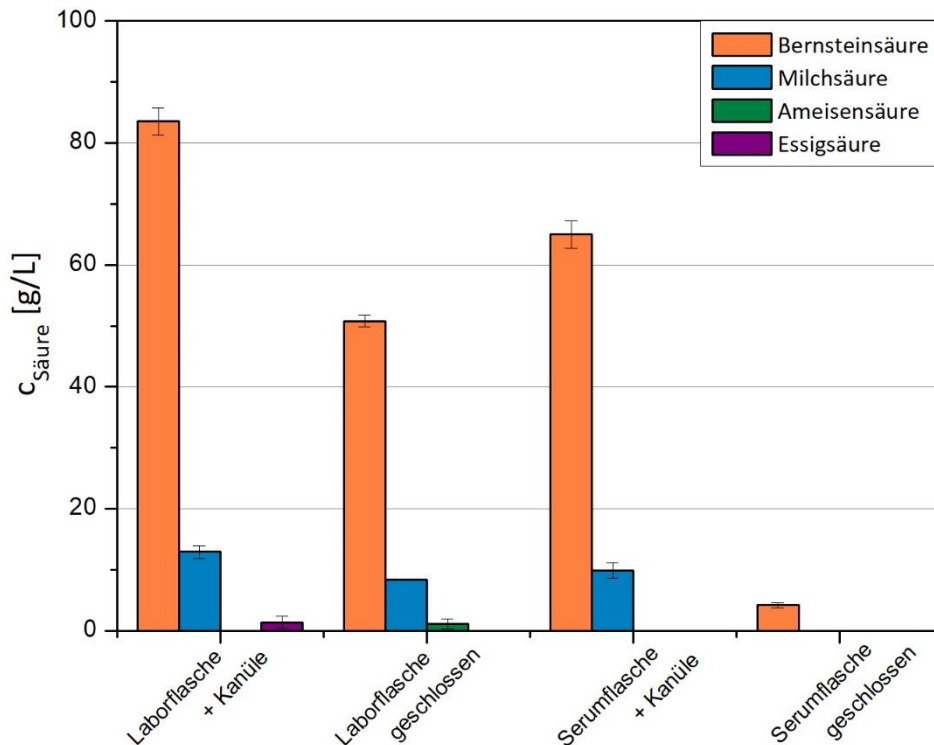


Abbildung 31: Kultivierungssysteme, die für eine mikroaerophile Produktion von Bernsteinsäure der Mischkultur DSM 32268 in Betracht gezogen wurden, Laborflaschen und Serumflaschen jeweils mit Deckel und Kanüle sowie geschlossen, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und MgCO_3 , Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Labor- bzw. Serumflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, nach 14 Tagen Kultivierungsdauer

Abbildung 31 zeigt, dass Bernsteinsäure in den untersuchten Kultivierungssystemen als Hauptprodukt gebildet wurde. Bei der Kultivierung in geschlossenen Serumflaschen wurde allerdings schnell deutlich, dass in diesem System nicht genügend Luft in der Flasche vorhanden war, sodass die Mischkultur DSM 32268 nur etwa 4 % von der Substratquelle Glycerin in Bernsteinsäure umsetzen konnte. Wurde die Serumflasche mit einer Kanüle versehen, stieg die Bernsteinsäure auf eine Konzentration von $65,0 \pm 2,2$ g/L an, jedoch verblieben etwa 25 g/L Glycerin unverwertet. Bis auf Milchsäure ($9,9 \pm 1,3$ g/L) waren allerdings keine weiteren Nebenprodukte aufzufinden. Bei der Kultivierung in einer geschlossenen Laborflasche entstand neben Milchsäure ($8,4 \pm 0,05$ g/L) auch Ameisensäure ($1,2 \pm 0,8$ g/L). Die Bernsteinsäurekonzentration war dagegen abermals geringer als in einem System mit minimaler Belüftung mit einer Kanüle. Die Mischkultur DSM 32268 produzierte in der geschlossenen Laborflasche nur $50,8 \pm 0,9$ g/L Bernsteinsäure, dabei wurden etwa 60 % des eingesetzten Glycerins verbraucht. Während bei dem geschlossenen System zusätzlich Ameisensäure gebildet wurde, war bei der Kultivierung in einer Laborflasche mit Kanüle Essigsäure mit einer Konzentration von $1,4 \pm 0,9$ g/L das Nebenprodukt. Bernsteinsäure erreichte einen Wert von $83,5 \pm 2,2$ g/L und somit die höchste Konzentration, die im Vergleich der Kultivierungssysteme erzielt wurde. Hierbei kam es zudem zu einem Vollumsatz des Substrats nach etwa 14-tägiger

Kultivierungsdauer. Im Unterschied zu den Serumflaschen wurde der Deckel bei den Laborflaschen bei jeder Probenahme geöffnet und anschließend wieder verschlossen, sodass dadurch mehr Luft in den Kopfraum der Laborflaschen gelangen konnte. Somit stand der Mischkultur DSM 32268 im weiteren Verlauf der Kultivierung ausreichend Luft für die mikroaerophile Produktion von Bernsteinsäure zur Verfügung. Für eine effiziente Bernsteinsäurebildung benötigte die Mischkultur DSM 32268 eine minimale Luftzufuhr, die durch die Kanüle im Deckel sowie durch täglich einmalige Probenahme gewährleistet wurde. Durch Öffnen der Laborflaschen herrschten höhere Sauerstoffpartialdrücke im Kopfraum. Infolgedessen nahm das Medium mehr Sauerstoff auf, bis der Partialdruck im Medium und der mit ihm in Kontakt stehenden Gasphase im Gleichgewicht war. Folglich verwendete die Mischkultur DSM 32268 diesen direkt für den Stoffwechsel zur Bildung von Bernsteinsäure⁷³. Ein zu geringer Lufteintrag führte dagegen zu einer Reduzierung der Produktbildung. Alle nachfolgenden Versuche wurden daher in Laborflaschen mit Septum und Kanüle im Deckel durchgeführt.

4.2.3 Einfluss der Probenahme auf das Wachstum, die Substratverwertung und Produktbildung

Die Kultivierungen wurden in Laborflaschen mit einem Septum und einer Kanüle im Deckel durchgeführt. Es wurde das Standardproduktionsmedium mit einer initialen Glycerinkonzentration von 100 g/L bei einer Temperatur von 32 °C und einer Schüttelfrequenz von 150 rpm verwendet. Der Einfluss der Probenahmehäufigkeit auf die Produktbildung wurde in Abbildung 32 zusammengefasst. Bei einer Standard-Kultivierung wurde einmal täglich fünfmal die Woche (Montag bis Freitag) der Deckel aufgeschraubt und eine Probe entnommen. Die Variationen in folgender Versuchsreihe waren:

- Probenahme zweimal täglich fünfmal die Woche (Montag bis Freitag)
- Probenahme einmal täglich sieben Mal die Woche (Montag bis Sonntag)
- Probenahme zweimal täglich siebenmal die Woche (Montag bis Sonntag)

Durch häufigeres Öffnen der Kulturflaschen gelangte mehr, beziehungsweise öfter, Luft in den Kopfraum der Flaschen. Eine Beeinflussung der Synthesewege der Mischkultur DSM 32268 und folglich veränderte Produktspektren könnten die Folge sein.

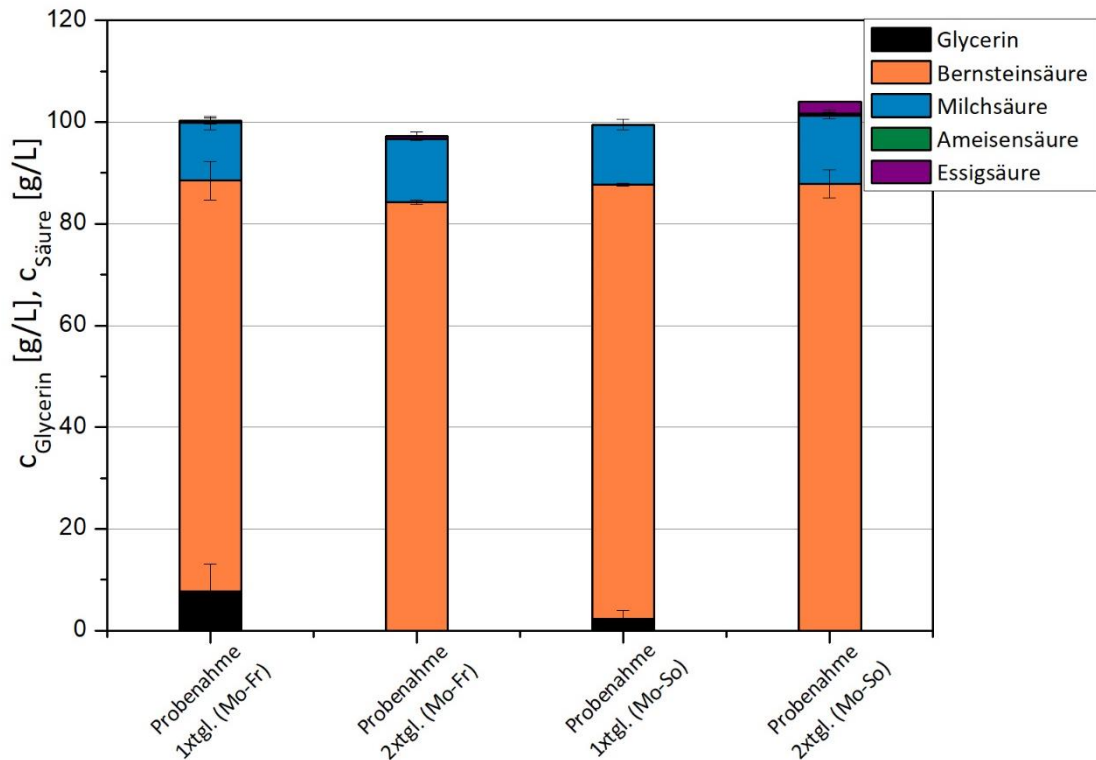


Abbildung 32: Produktspektrum der Laborflaschen-Kultivierungen der Mischkultur DSM 32268 mit Einfluss der Probenahme nach 11 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und MgCO_3 , T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Mo: Montag, Fr: Freitag, So: Sonntag

Die Standard-Kultivierung mit einer täglichen Probenahme von Montag bis Freitag erzielte eine Bernsteinsäurekonzentration von $80,9 \pm 3,8$ g/L, eine tägliche Probenahme an jedem Wochentag resultierte in $85,4 \pm 0,3$ g/L Bernsteinsäure. Wurde die Probenahme verdoppelt, wurde während der Probenahme von Montag bis Freitag eine Bernsteinmenge von $84,3 \pm 0,4$ g/L und bei der Probenahme von Montag bis Sonntag eine Konzentration von $87,9 \pm 2,8$ g/L erlangt. Die Nebenprodukte, mit Milchsäure als vorrangiges Produkt, machten etwa eine Gesamtmenge von 12 bis 14 g/L aus, wobei durch häufiges Öffnen der Flaschen (Probenahme zweimal täglich jeden Tag in der Woche (Montag bis Sonntag)) Essigsäure (etwa 3 g/L) zu einem etwas höheren Anteil gebildet wurde. Des Weiteren war das eingesetzte Glycerin bei zweimaligem Öffnen bereits nach 10 (Montag – Sonntag) bzw. 11 (Montag – Freitag) Tagen der Kultivierung aufgebraucht, während bei einmaliger Probenahme noch restliches Glycerin zum Verzehr vorlag. Der unterschiedliche Substratverbrauch wirkte sich allerdings nur wenig auf den Ertragskoeffizienten aus, der bei allen Kultivierungen etwa 0,9 g/g betrug. Einzig die maximale Produktivität bei zweimaliger Probenahme unterschied sich von der bei einmaliger Probenahme, während erst genannte bei 0,60 g/(L·h) lag, sowohl bei einer Beprobung von Montag bis Freitag wie auch von Montag bis Sonntag, resultierte die einmalige Probenahme in einem Wert von 0,50 g/(L·h).

Abgesehen von dieser Ausnahme wurde durch eine häufigere Probenahme während der Kultivierung die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268 nicht maßgeblich beeinflusst. Der Einfluss der Probenahme bewirkte nur minimale Unterschiede bei der Bildung von Bernsteinsäure. Die Probenahme fand daher weiterhin einmal täglich fünfmal die Woche statt.

Eine Verschiebung des Stoffwechselwegs aufgrund höherer Luftzufuhr wurde nicht detektiert. Die kurze Zeitspanne, die für die Probenahme benötigt wurde, hat nur einen marginalen Einfluss auf die Zeit zwischen den Probenahmezeitpunkten sowie auf die gesamte Kultivierungsdauer. Somit wurde das mikroaerophile Milieu wieder möglichst schnell durch die Mischkultur DSM 32268 eingestellt.

4.2.4 Einfluss der Schüttelfrequenz

Neben der Probenahmehäufigkeit wurde auch die Schüttelfrequenz in Bezug auf Wachstum und Produktbildung untersucht. Die Schüttelfrequenz wurde in einem Bereich zwischen 100 und 250 rpm variiert (Abbildung 33). Die bisherigen Experimente wurden bei 150 rpm durchgeführt. Es wurde eine Anfangs-Glycerinkonzentration von 50 g/L im Kultivierungssystem Laborflasche mit Septum und Kanüle eingesetzt. Die Füllmenge betrug 50 mL.

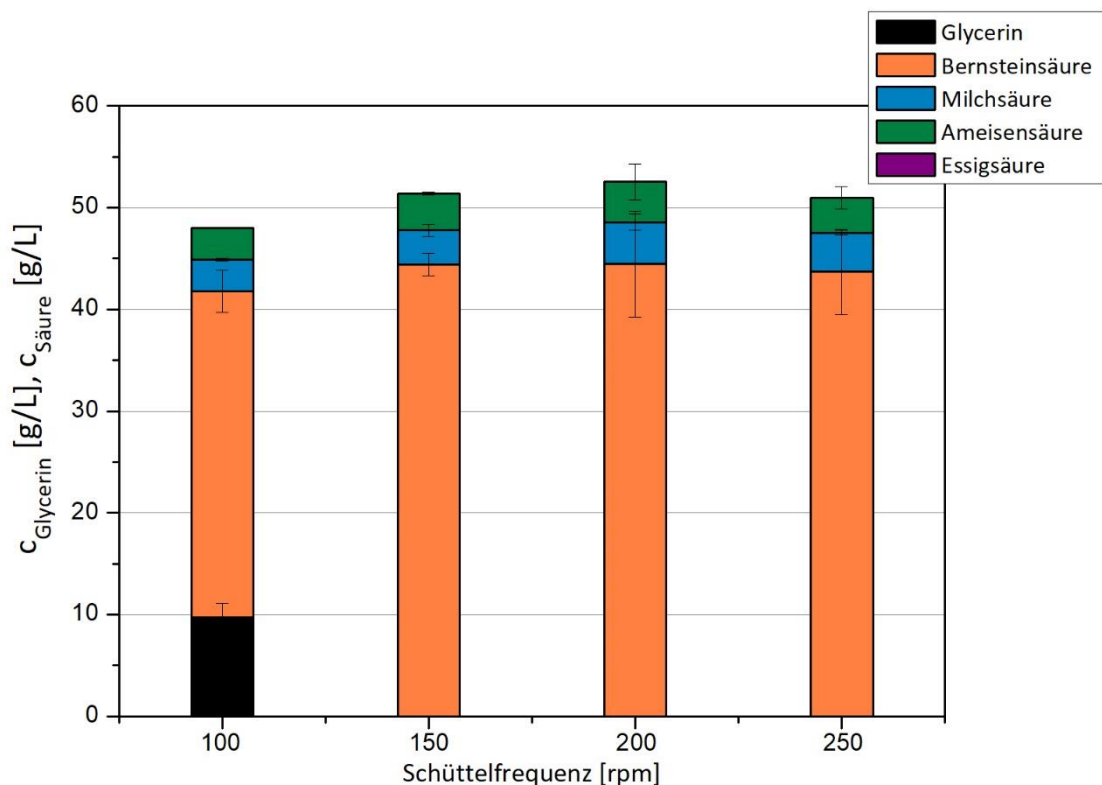


Abbildung 33: Einfluss der Schüttelfrequenz des Inkubators auf die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Produktbildung war im gesamten Bereich möglich. Die höchste Produktmenge mit einer Bernsteinsäurekonzentration von etwa 44 g/L wurde im Schüttelfrequenzbereich zwischen 150 und 250 rpm erreicht. Bei einer Schüttelfrequenz von 100 rpm wurden lediglich $32,1 \pm 2,1$ g/L Bernsteinsäure gebildet. Die Nebenproduktmengen blieben unabhängig von der Schüttelfrequenz konstant. Nur bei einer Schüttelfrequenz von 100 rpm fand kein Vollumsatz des Substrats statt, nach 8-tägiger Kultivierungsdauer wurde eine Rest-Glycerinkonzentration von 10 g/L detektiert. Bei den übrigen Variationen wurde das Substrat vollständig verwertet, bei 150 und 200 rpm nach 7 Tagen, bei 250 rpm nach 8 Tagen Kultivierung. Dies spiegelte sich vor allem beim Ertragskoeffizienten und der Produktivität wider, die bei $0,78 \pm 0,06$ g/g und $0,17 \pm 0,01$ g/(L·h) für 100 rpm lagen und damit deutlich unter den Werten der übrigen Schüttelfrequenzen von $0,90 \pm 0,06$ g/g bei 150 rpm, $0,92 \pm 0,08$ g/g bei 200 rpm und $0,88 \pm 0,04$ g/g bei 250 rpm. Die Produktivität dagegen belief sich im Schüttelfrequenzbereich zwischen 150 und 250 rpm auf $0,23$ g/(L·h). Da bereits vorhergehende Kultivierungen bei einer Schüttelfrequenz von 150 rpm durchgeführt wurden und die Resultate sich nicht wesentlich von den bei 200 rpm unterschieden, wurde für folgende Versuchsreihen eine Schüttelfrequenz von 150 rpm beibehalten.

4.2.5 Einfluss des Arbeitsvolumens

Das Arbeitsvolumen in den Laborflaschen bestimmt die Menge an Luft im Kopfraum der Flaschen, zusätzlich zur standardmäßigen Belüftung mit einer Kanüle. Je größer das Arbeitsvolumen gewählt wird, desto weniger Luft steht dem Mikroorganismus während der Kultivierung zur Verfügung. Die bisherigen Kultivierungen wurden mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL durchgeführt. Die Arbeitsvolumina wurden in einem Bereich von 30 bis 70 mL variiert und deren Einfluss auf die Optische Dichte (OD_{605nm}), Substratverwertung und Produktbildung untersucht. Die Kultivierungen wurden auf Standardproduktionsmedium mit einer Glycerinmenge von 100 g/L bei einer Temperatur von 32 °C und einer Schüttelfrequenz von 150 rpm durchgeführt. In Abbildung 34 ist der zeitliche Verlauf der Optischen Dichte für die unterschiedlichen Arbeitsvolumina dargestellt.

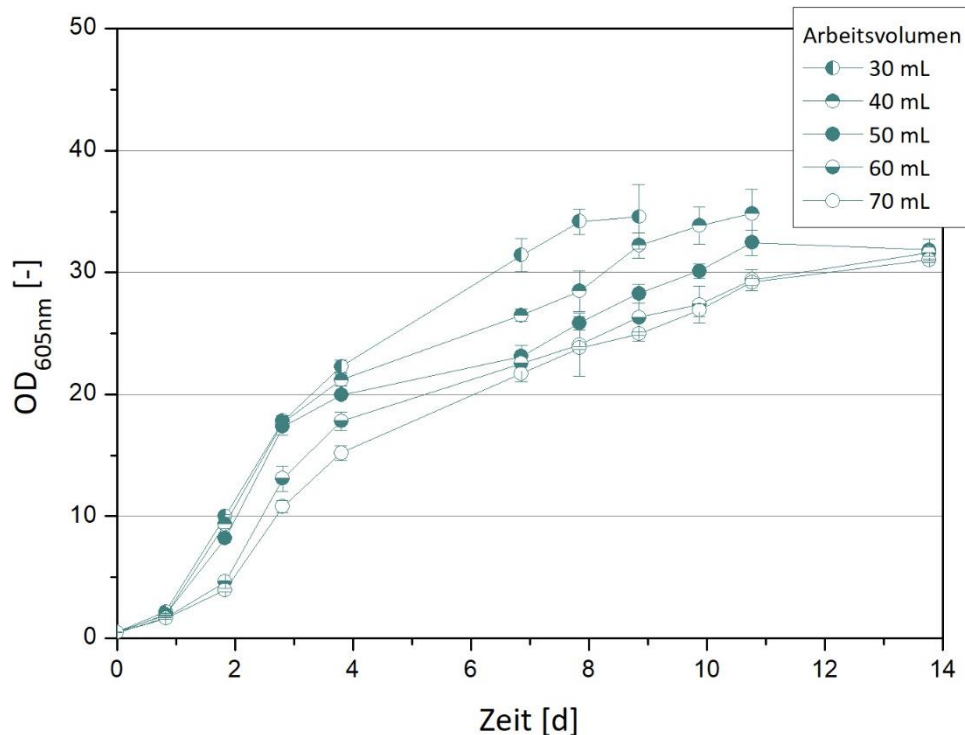


Abbildung 34: Einfluss des Arbeitsvolumens in den Laborflaschen auf die Optische Dichte ($OD_{605\text{ nm}}$) der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$ mit 14 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen variabel von 30 bis 70 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Die $OD_{605\text{ nm}}$ stieg ab einem Arbeitsvolumen von 60 mL deutlich langsamer an als es bei den übrigen Variationen der Fall war. Bis Tag 3 der Kultivierung verlief die Optische Dichte der Variationen 30 mL, 40 mL und 50 mL nahezu identisch, anschließend resultierte das geringste Arbeitsvolumen nach 9 Tagen in einem Maximum von OD_{605} $34,6 \pm 2,6$. Ein Vergleich der OD-Werte nach 9 tägiger Kultivierungsdauer zeigte außerdem auf, dass mit zunehmendem Arbeitsvolumen die Optische Dichte sank und somit eine längere Kultivierungsdauer für die vollständige Substratumsetzung veranschlagt wurde.

In Abbildung 35 ist daher die Substratverwertung und Produktbildung der Mischkultur DSM 32268 über eine Kultivierungsdauer von 14 Tagen in Abhängigkeit des Arbeitsvolumens dargestellt. Bei der Standard-Kultivierung mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL war das eingesetzte Glycerin mit einer Konzentration von 100 g/L nach 14 Tagen aufgebraucht. Betrachtet man allerdings die fehlende Probenahme zwischen Tag 11 und 14, wäre das Substrat bereits nach 12 Tagen Kultivierung vollständig verwertet worden. Bei den Arbeitsvolumina darunter (30 mL und 40 mL) wurde das Glycerin bereits nach 9 beziehungsweise 11 Tagen aufgezehrt. Bei Arbeitsvolumina über 50 mL lag nach Ende der Kultivierung (14 Tage) noch restliches Glycerin mit einer Menge von 15 g/L (60 mL) und 25 g/L (70 mL) vor.

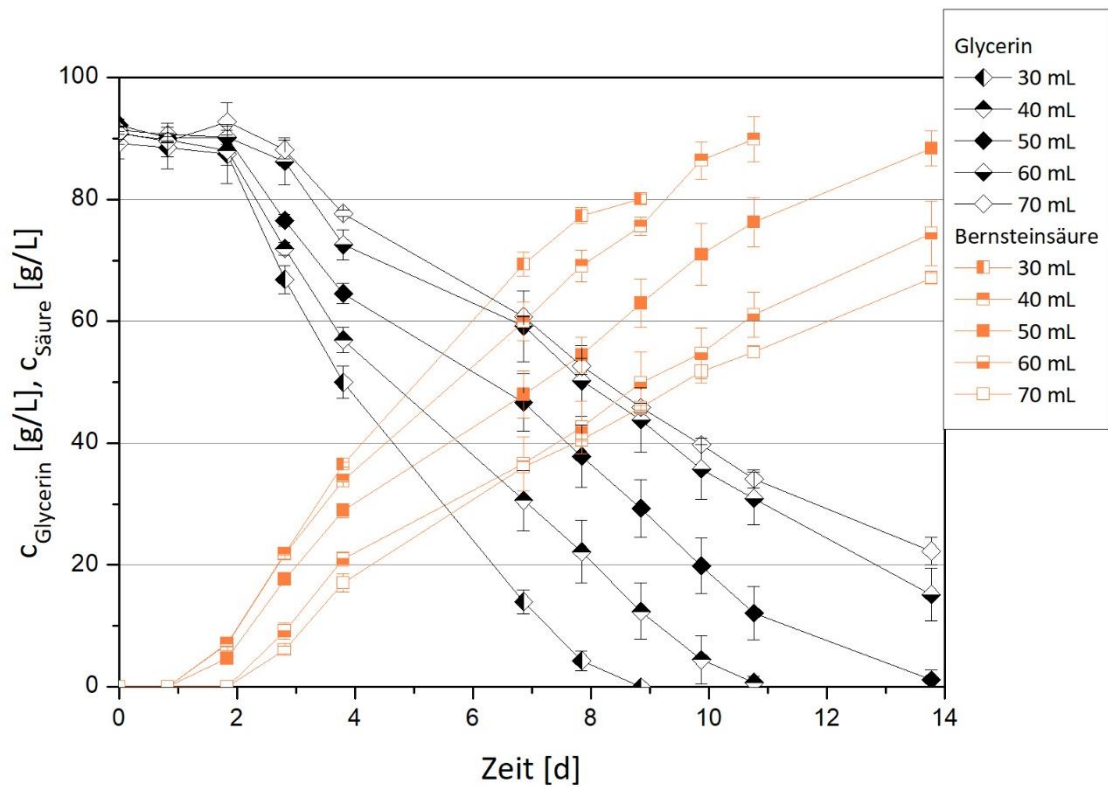


Abbildung 35: Einfluss des Arbeitsvolumens auf die Substratverwertung und Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und MgCO_3 , Arbeitsvolumen variabel von 30 bis 70 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Die in Abbildung 36 dargestellten Bernsteinsäure-Endtiter zeigen, dass ein Arbeitsvolumen zwischen 40 und 50 mL zur höchsten erzielten Produktkonzentration führte, darunter und darüber die Bernsteinsäurekonzentration jedoch wieder absank. Die Mischkultur DSM 32268 schien bei Arbeitsvolumen unter 40 und über 50 mL nicht das mikroaerophile Milieu einstellen zu können, welches für eine effiziente Bernsteinsäureproduktion notwendig ist. Herrschten sauerstoffarme oder -reiche Bedingungen wurde der Mikroorganismus gehemmt und reduzierte die Bildung des Stoffwechselprodukts Bernsteinsäure.

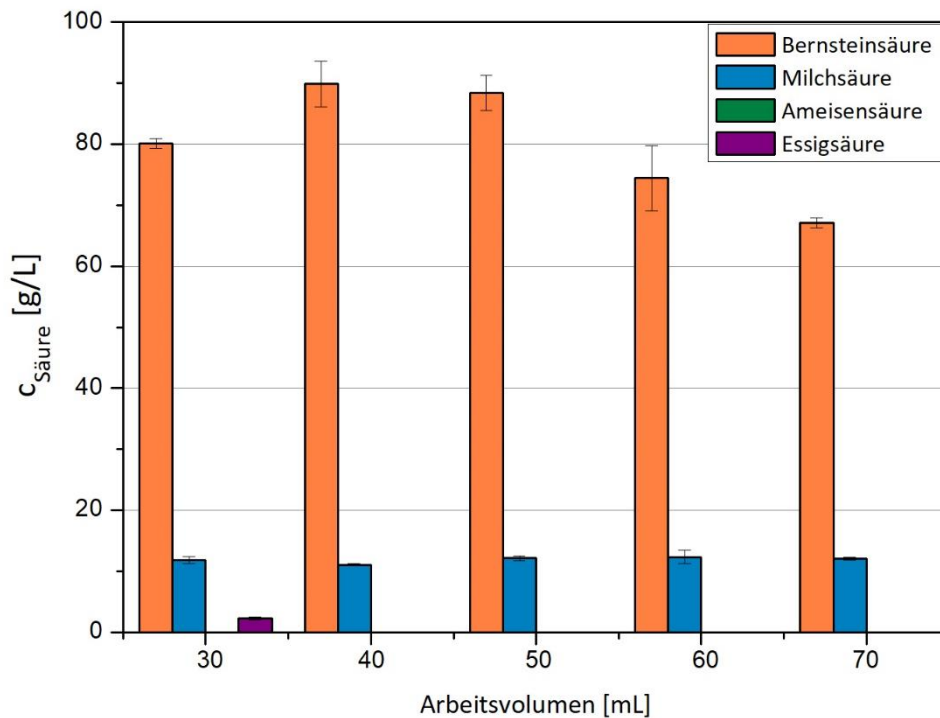


Abbildung 36: Einfluss des Arbeitsvolumens auf die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, End-Titer nach vollständigem Aufbrauchen des Substrats bzw. nach maximal 14 Tagen, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und MgCO_3 , Arbeitsvolumen variabel zwischen 30 und 70 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Bei einem Arbeitsvolumen von 30 mL wurde eine geringe Menge an Essigsäure gebildet (ca. 2 g/L), die Milchsäurekonzentration blieb dagegen in allen Variationen konstant bei einem Wert von etwa 12 g/L. Folgende Kultivierungen wurden daher, wie bisher, bei einem Arbeitsvolumen von 50 mL fortgeführt.

4.2.6 Einfluss der Temperatur

Die bisherigen Versuche wurden bei einer Temperatur von 32 °C durchgeführt. Für die weiteren Versuchsreihen mit der Mischkultur DSM 32268 sollte nun die optimale Wachstums- und Produktionstemperatur bestimmt werden. Die Kultivierung erfolgte in Laborflaschen mit Septum und Kanüle mit einem Füllvolumen von 50 mL bei 150 rpm. Die Temperatur wurde von 27 – 42 °C variiert (Abbildung 37). Es wurde das Standardproduktionsmedium mit einer initialen Glycerinkonzentration von 50 g/L verwendet.

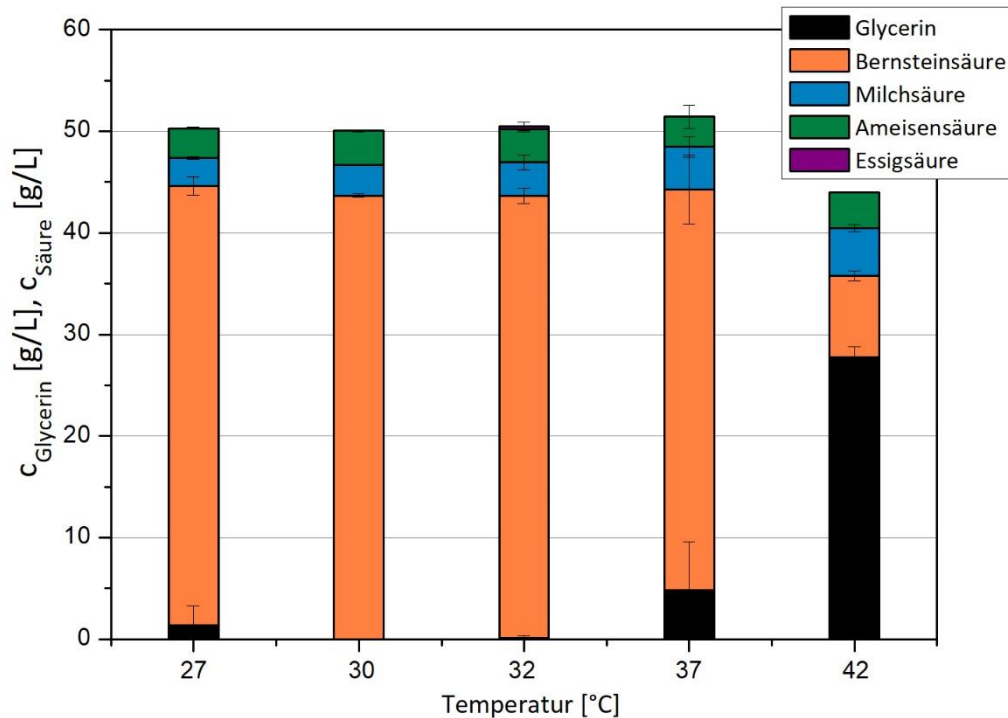


Abbildung 37: Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Die Mischkultur DSM 32268 wuchs und produzierte Bernsteinsäure im gesamten Temperaturbereich. Ab einer Temperatur von 42 °C fiel die Bernsteinsäurekonzentration allerdings stark ab, vom eingesetzten Glycerin wurden nur 40 % verbraucht. Dadurch wurden ein Ertragskoeffizient und eine Produktivität von $0,34 \pm 0,03$ g/g und $0,04$ g/(L·h) erzielt. Im Bereich zwischen 27 und 32 °C wurde die höchste Produktmenge mit etwa 43 g/L gebildet, wobei das Substrat nahezu vollständig umgesetzt wurde. Zudem konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Werten für den Ertragskoeffizienten bei diesen Temperaturvariationen ausgemacht werden. Dieser belief sich bei 27 °C auf einen Wert von $0,92 \pm 0,06$ g/g, bei den übrigen untersuchten Temperaturen auf 0,93 g/g. Die Produktivität ist mit $0,23$ g/(L·h) anzugeben. Die Enzyme des Stoffwechsels zur Bildung von Bernsteinsäure wurden möglicherweise bei einer Temperatur von 42 °C unwirksam, wodurch die geringere Bernsteinsäureproduktion zu erklären ist. Die Nebenproduktbildung blieb dagegen im gesamten untersuchten Temperaturbereich konstant. Mit erhöhter Temperatur wäre eine Inhibierung der Nebenproduktbildung zu erwarten gewesen. Möglicherweise wurden aber nur die Enzyme des bernsteinsäurebildenden Isolats durch die erhöhte Temperatur denaturiert. Die Nebenprodukte könnten auf die *Paenibacillus*-Spezies zurückzuführen sein, da ein Überleben bis zu einem Temperaturbereich von 45 bis 50 °C möglich ist⁶⁸. Im Temperaturbereich zwischen 27 °C und 42 °C wurde die Optische Dichte, dargestellt in Abbildung 38, aufgenommen.

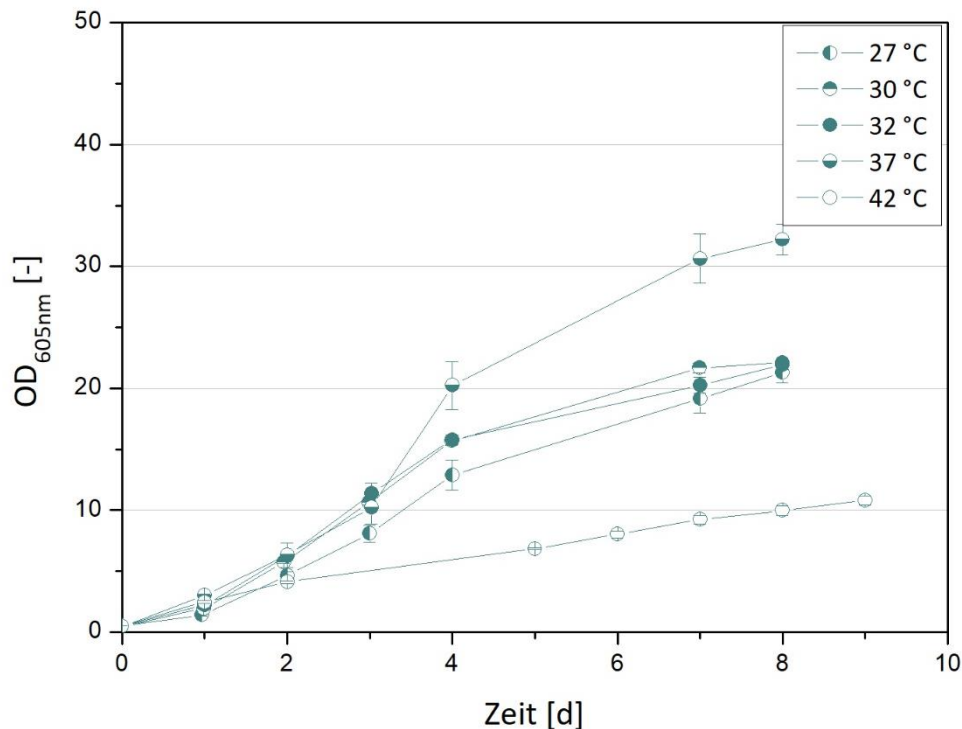


Abbildung 38: Einfluss der Temperatur auf die Optische Dichte der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

In diesem Bereich wurde Wachstum für die Mischkultur DSM 32268 ermöglicht. Ausgehend von 27 °C zeigte eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur marginale Unterschiede in den erzielten Werten für die Optische Dichte und mündeten bei einem Endwert von $\text{OD}_{605\text{nm}}$ von 21. Eine Beeinflussung der lag-Phase wurde dabei nicht festgestellt. Allerdings wurde das Wachstum ab einer Temperatur von 42 °C deutlich gehemmt. Bis Tag 2 der Kultivierung schien die erhöhte Temperatur keine Auswirkung auf die Optische Dichte zu haben und lag, wie bei den anderen Variationen, bei einem Wert von $\text{OD}_{605\text{nm}}$ 4 bis 6. Die maximale $\text{OD}_{605\text{nm}}$ erreichte nach 9 Tagen einen Endwert von $\text{OD}_{605\text{nm}}$ $10,9 \pm 0,4$ und lag damit deutlich unter den erzielten Endwerten der übrigen Variationen. Aufgrund der wachstumsgekoppelten Produktion spiegelte sich das geringere Wachstum der Mischkultur DSM 32268 auch in dessen Produktion wider, wie in Abbildung 37 dargestellt.

Eine Kultivierungstemperatur von 32 °C wurde bevorzugt, da diese im größeren Maßstab energetisch günstiger ist. Die folgenden Kultivierungen mit der Mischkultur DSM 32268 wurden daher bei 32 °C fortgeführt.

4.2.7 Einfluss der Inokulationsmenge

In folgender Versuchsreihe wurde das Volumen des Inokulums zwischen 1 und 10 % variiert. Aus einer bei 4 °C lagernden Arbeitskulture wurde die entsprechende Menge entnommen, mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und das frische Medium mit dem resuspendierten Pellet

Ergebnisse und Diskussion

beimpft. Die eingesetzte Glycerinkonzentration des Standardproduktionsmediums betrug 100 g/L, das Arbeitsvolumen 50 mL. Bisherige Kultivierungen wurden mit einem Volumen von 2 % angeimpft.

Zunächst wurde der Einfluss der Inokulationsmenge auf den Verlauf der Optischen Dichte überprüft (Abbildung 39). Die jeweiligen OD_{605nm} -Werte zu Beginn der Kultivierung betrugen:

- OD_{605nm} $0,73 \pm 0,03$ bei 1 %
- OD_{605nm} $0,81 \pm 0,08$ bei 2 %
- OD_{605nm} $1,00 \pm 0,04$ bei 5 %
- OD_{605nm} $1,23 \pm 0,05$ bei 10 %

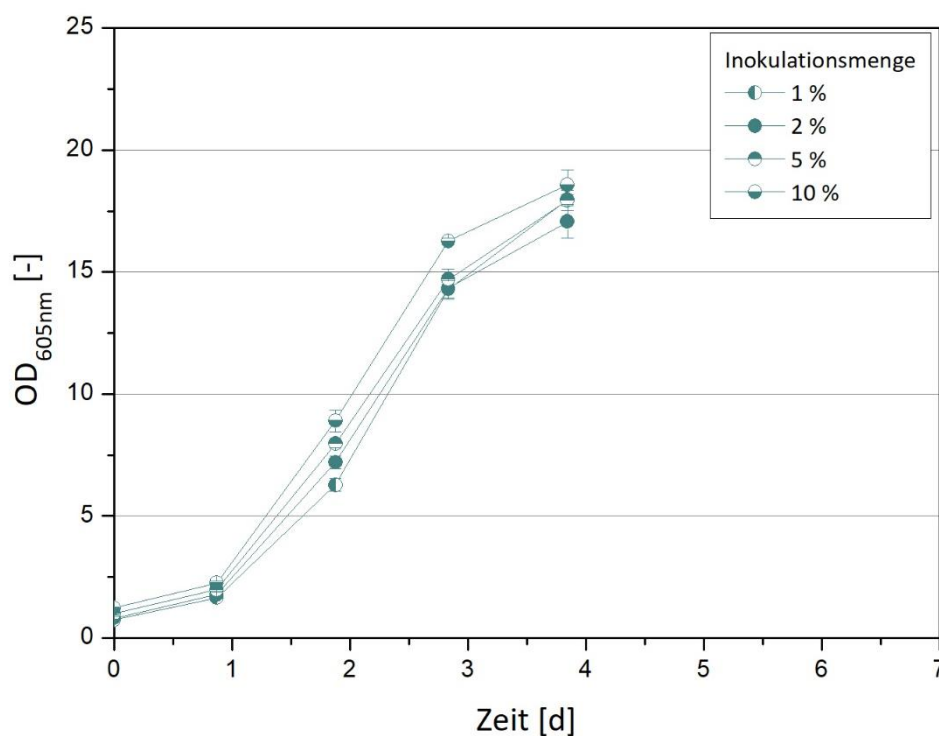


Abbildung 39: Einfluss der Inokulationsmenge auf den Verlauf der Optischen Dichte (OD_{605nm}) der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$ nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Ausgehend von der höheren OD_{605nm} bei einer Inokulationsmenge von 10 % zeichnete sich ein steilerer Verlauf des Wachstums ab. Die Dauer bis zum Erreichen der stationären Phase nach 4 Tagen Kultivierungsdauer war jedoch bei allen Variationen gleich. Nach dieser Zeit lag der Endwert der Optischen Dichte bei etwa OD_{605nm} $17,9 \pm 0,5$, dabei schien es unerheblich zu sein, mit welchem Volumen die Kultivierungen zuvor inokuliert wurden. Während einer Referenzkultivierung auf Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin ist bei Vollumsatz nach etwa 7 Tagen Kultivierungsdauer ein Endwert von OD_{605nm} 20 möglich. Eine Erhöhung der Inokulationsmenge resultierte nicht in einer Verkürzung der lag-Phase, wie dies bei Lee *et al.*

(1999)⁷⁴ belegt wurde. Weiterhin konnte das entsprechende Milieu, das für die Produktion von Bernsteinsäure benötigt wurde, durch eine höhere Zellzahl nicht schneller erreicht werden. Die Produktivitäten (Abbildung 40), sowohl gesamt als auch maximal, zeigten innerhalb der Variationen kaum Unterschiede. Nach 4 Tagen Kultivierungsdauer wurde eine Gesamt-Produktivität von $0,26 \pm 0,01 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ erzielt, die maximale Produktivität während des Prozesses lag bei etwa $0,45 \pm 0,03 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$.

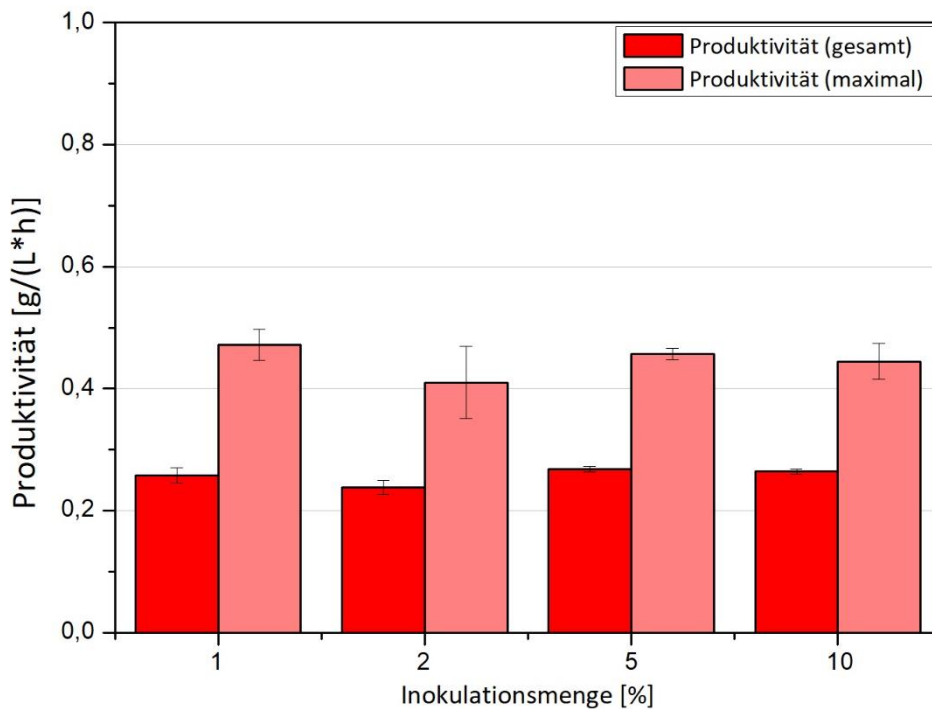


Abbildung 40: Einfluss der Inokulationsmenge auf die Produktivität (gesamt und maximal) der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

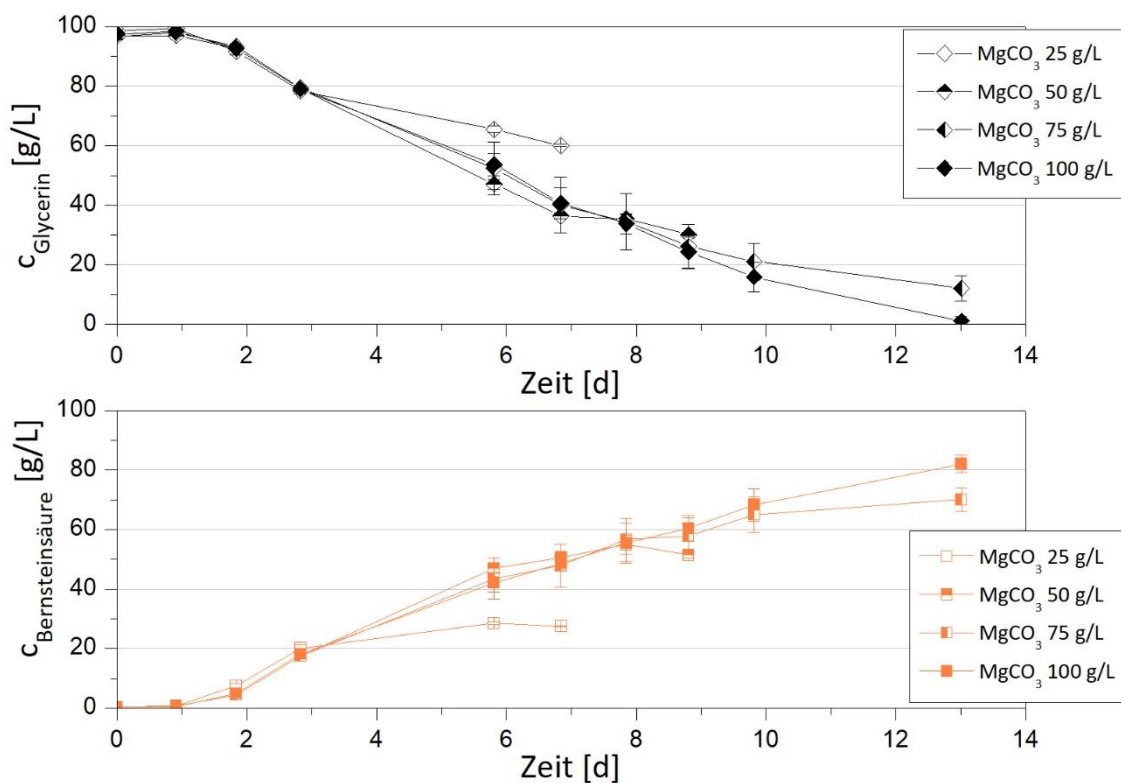
Entgegen der Erwartung wurde weder die finale Zellkonzentration erhöht, noch die Kultivierungsdauer verkürzt und somit die Produktivität erhöht⁷⁴. Zu Beginn der Kultivierung schien nicht die Zellzahl entscheidend zu sein, sondern dass der *Paenibacillus lautus* in der Mischkultur DSM 32268 das für die Produktion von Bernsteinsäure günstige Milieu hervorbringt. Zudem ist die Verteilung von der *Paenibacillus*-Spezies und des unbekannten Actinobacteria-Isolats in der Mischkultur DSM 32268 bei einer größeren Inokulationsmenge nicht verändert, sodass die Zeit zur Anpassung des geeigneten Milieus nicht verkürzt werden konnte. Anstehende Kultivierungen wurden daher weiterhin mit einem Volumen von 2 % angeimpft.

4.2.8 Einfluss des Neutralisationsmittels

4.2.8.1 Einfluss der Magnesiumcarbonatkonzentration

Eine variierende MgCO_3 -Konzentration von 25 bis 100 g/L wurde bei gleichbleibender Glycerinkonzentration von 100 g/L untersucht. Bisherige Kultivierungen wurden mit identischen Mengen an Glycerin und Magnesiumcarbonat durchgeführt.

Neben der Substratverwertung und Produktbildung sind auch der Verlauf der Optischen Dichte $\text{OD}_{605\text{nm}}$ und des pH-Wertes in Abbildung 41 aufgeführt. Magnesiumcarbonat, welches praktisch unlöslich ist, diente bei der Kultivierung nicht nur als CO_2 -Quelle, sondern auch als pH-Regulator.



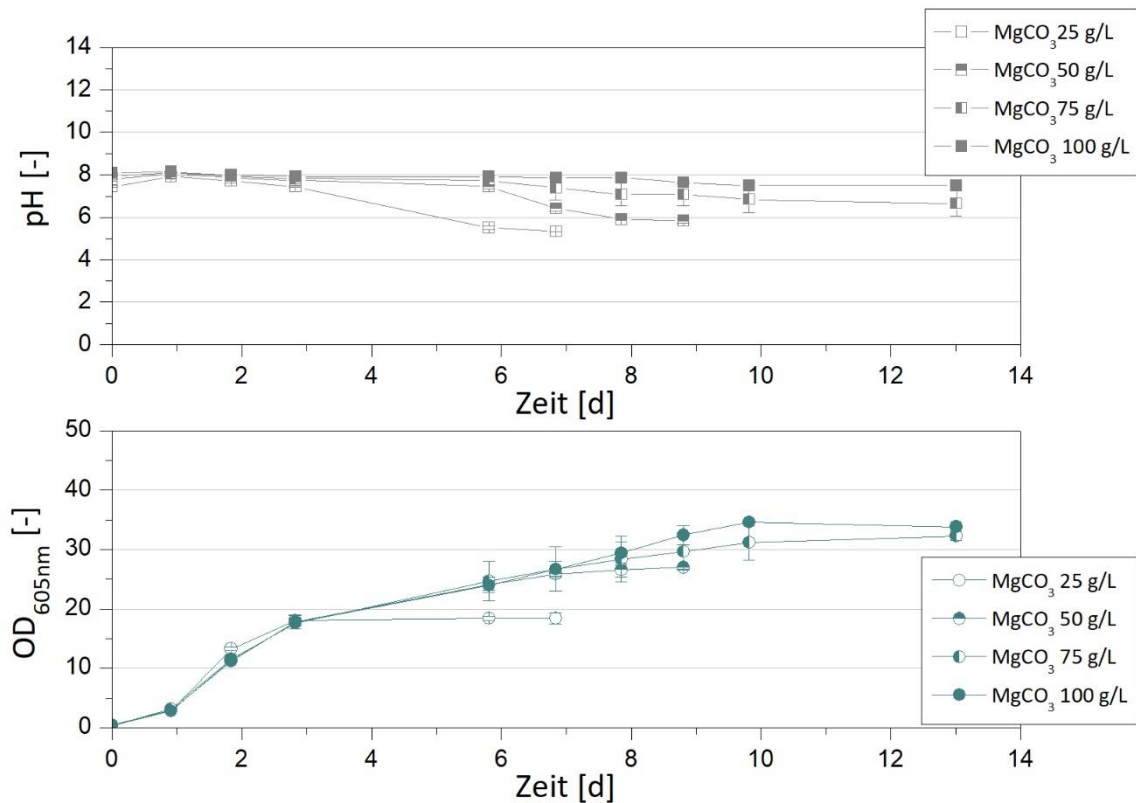


Abbildung 41: Einfluss der Magnesiumcarbonatmenge auf das Wachstum (OD_{605nm}), den pH-Wert und die Substratverwertung sowie Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin, $MgCO_3$ -Konzentration variabel zwischen 25 und 100 g/L bei einer Kultivierungsdauer von 13 Tagen, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Eine effiziente Bernsteinsäureproduktion war solange gewährleistet, solange der pH-Wert im Bereich zwischen pH 7 und 8 gehalten wurde. Durch die Verwertung des Magnesiumcarbonats während der Kultivierung, sank der pH-Wert stetig ab. Eine Inhibierung der Bernsteinsäureproduktion erfolgte ab einem pH-Wert von pH 6. Dies erfolgte nach etwa 4 Tagen Kultivierung bei einer Menge von 25 g/L $MgCO_3$. Gleichzeitig stagnierte auch das Wachstum, die Optische Dichte OD_{605nm} war ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende der Kultivierung von 7 Tagen gleichbleibend. Das eingesetzte Glycerin wurde zudem nicht weiter aufgebraucht. Wird die Magnesiumcarbonatkonzentration in der Kultursuspension erhöht, kann der pH-Wert demnach länger stabil gehalten werden, so zu sehen ab einer Konzentration von 50 g/L. Ebenso trat eine Inhibierung schließlich nach 8-tägiger Kultivierungsdauer ein. Zwischen Tag 6 und 7 sank der pH-Wert sprunghaft von pH 7,4 auf pH 6,4 ab, einhergehend mit einer Stagnation der Optischen Dichte. Erst bei einer $MgCO_3$ -Menge von 100 g/L, also identisch zur eingesetzten Glycerinmenge, war die Mischkultur DSM 32268 befähigt das Substrat innerhalb von 13 Tagen vollständig zu verwerten, um damit die höchste Bernsteinsäurekonzentration von $82 \pm 2,9$ g/L zu erzielen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass für diesen Prozess die Mengen an Glycerin- und Magnesiumcarbonat gleich sein sollten, damit die Produktbildung effizient abläuft. Durch unzureichende Mengen an Magnesiumcarbonat verliert die Mischkultur DSM 32268 nicht nur den pH-Regulator für diesen Prozess, sondern viel mehr auch die CO_2 -Quelle für deren Bernsteinsäureproduktion.

4.2.8.2 Einsatz anderer Carbonatquellen für die Bernsteinsäureproduktion

MgCO_3 fungierte in diesem Prozess als Puffersystem. Durch sich lösendes MgCO_3 wird ein Abfallen des pH-Wertes verhindert⁴⁷. Daraus resultierendes $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ kann dann als zusätzliches Substrat dienen. Die Bernsteinsäureproduktion der Mischkultur DSM 32268 wird durch das Niveau des verfügbaren Kohlendioxids und den pH-Wert der Kultur reguliert⁷⁵. Ein großer Nachteil und daher für industrielle Prozesse eher ungeeignet ist die Unlöslichkeit in Wasser. Daher wurde neben einer weiteren unlöslichen Carbonatquelle wie Calciumcarbonat auch eine lösliche, in Form von Natriumhydrogencarbonat, untersucht (Abbildung 42). Da eine kontinuierliche Titration in den Laborflaschen über den Kultivierungszeitraum nicht möglich ist, wurde Natriumhydrogencarbonat als einzige lösliche CO_2 -Quelle gewählt. Eine pH-Regulierung im Bereich von pH 7 bis 8 konnte bei einer eingesetzten Konzentration von 25 g/L über eine Kultivierungsdauer von 8 Tagen gewährleistet werden.

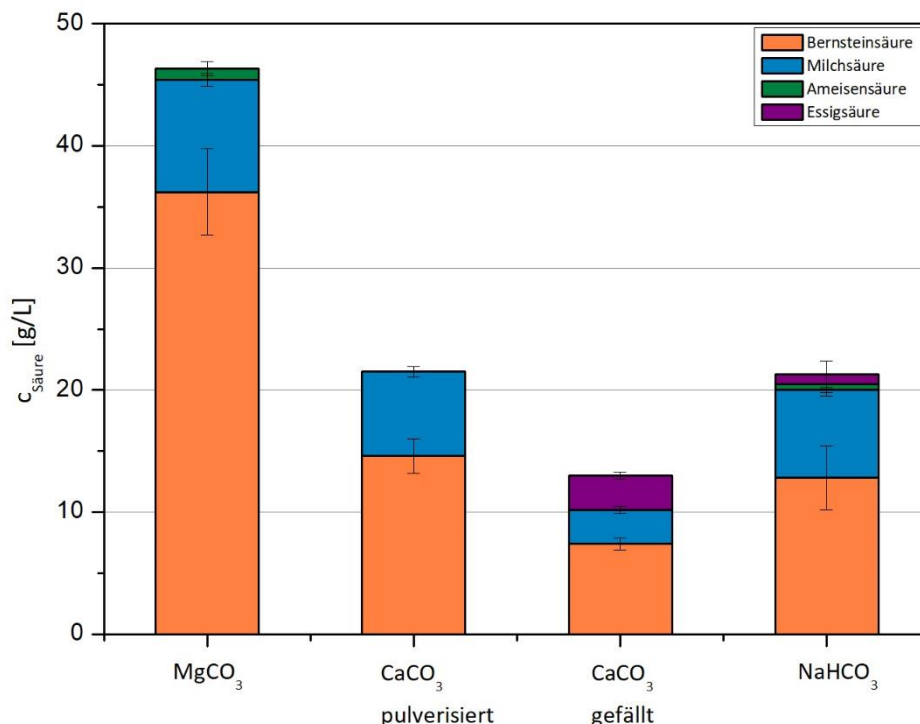


Abbildung 42: Prüfung verschiedener Carbonatquellen auf ihre Eignung zur Produktion von Bernsteinsäure, Glycerinkonzentration: 50 g/L, Carbonatkonzentration: MgCO_3 50 g/L, CaCO_3 (pulverisiert und gefällt) 50 g/L, NaHCO_3 25 g/L, bei einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Das Produktspektrum der eingesetzten Carbonatquellen in den Kultivierungen unterschied sich deutlich voneinander. Mit Magnesiumcarbonat wurde die höchste Bernsteinsäurekonzentration von $36,2 \pm 3,6$ g/L erzielt. Dagegen wurde mit NaHCO_3 eine Bernsteinsäuremenge von $12,8 \pm 2,6$ g/L, mit pulverisiertem CaCO_3 eine Menge von $14,6 \pm 1,4$ g/L erreicht. Gefälltes Calciumcarbonat beeinflusste die Bildung von Bernsteinsäure negativ ($7,4 \pm 0,5$ g/L), begünstigte allerdings die Essigsäureproduktion ($2,8 \pm 0,3$ g/L). Auffällig ist zudem, dass die Kultivierung mit pulverisiertem Calciumcarbonat neben Milchsäure keinerlei Nebenprodukte hervorbrachte, wie es jedoch bei NaHCO_3 (Ameisensäure $0,5 \pm 0,6$ g/L, Essigsäure $0,8 \pm 1,1$ g/L) der Fall war. Zusätzlich zeigt Abbildung 43 den pH-Verlauf während der Kultivierungen. Die Start-pH-Werte waren:

- MgCO_3 pH 7,51
- CaCO_3 pulverisiert pH 6,53
- CaCO_3 gefällt pH 6,11
- NaHCO_3 pH 8,43.

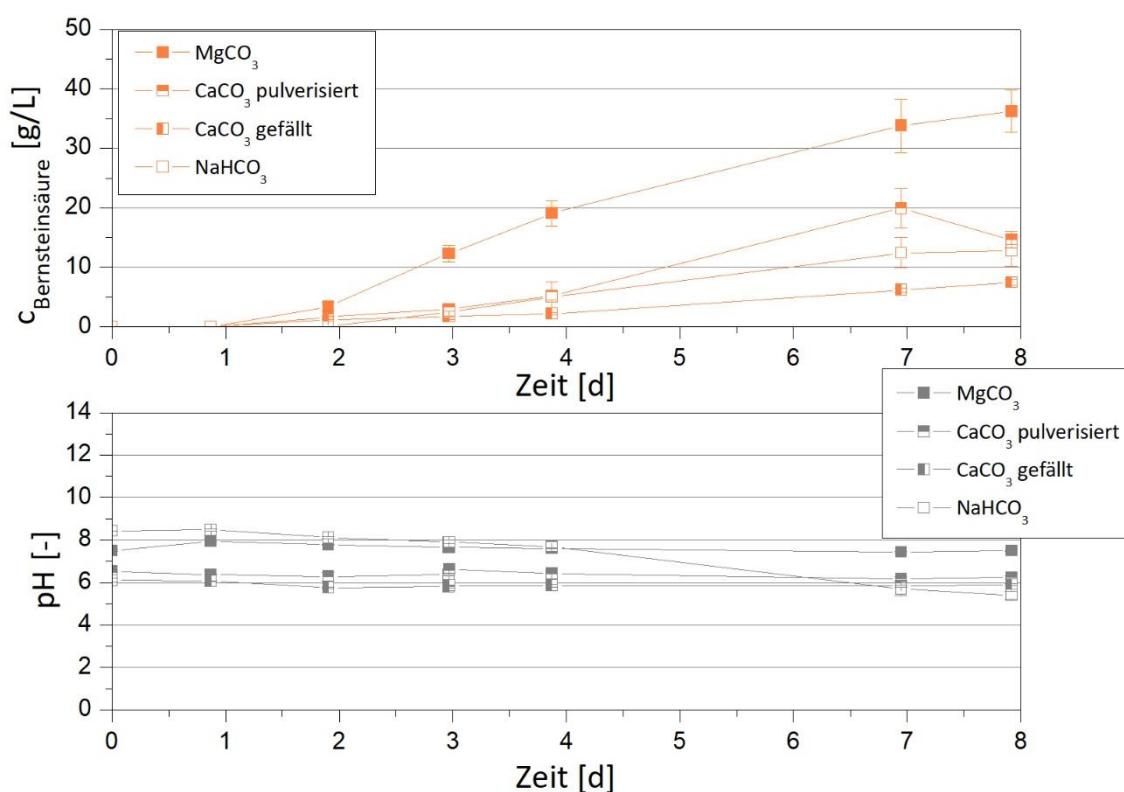


Abbildung 43: Verlauf des pH-Wertes bei der Kultivierung mit verschiedenen Carbonatquellen, Glycérinkonzentration: 50 g/L, Carbonatkonzentration: MgCO_3 : 50 g/L, CaCO_3 (pulverisiert und gefällt): 50 g/L, NaHCO_3 : 25 g/L, bei einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

In Abbildung 43 ist der pH-Wert-Verlauf der Carbonatquellen im Vergleich zur Bernsteinsäurekonzentration dargestellt. Während der 8-tägigen Kultivierungsdauer wurde der pH-Wert mit MgCO_3 konstant bei etwa pH 7,8 aufrecht gehalten. Der Verlauf bei NaHCO_3 zeigt ein

Absinken des pH-Wertes ab Tag 4, der in einem Minimum von pH 5,4 nach 8 Tagen resultierte und somit den vollständigen Verbrauch der Carbonatquelle aufzeigte. Weiterhin wird deutlich, dass sich pulverisiertes CaCO_3 besser als gefälltes CaCO_3 eignete (Abbildung 42). Der pH-Verlauf während der Kultivierung verlief nahezu identisch. Die Calciumcarbonate pufferten über die Kultivierungsdauer von 8 Tagen im Bereich von pH 6,5 bis pH 6. Für das gewählte Kultivierungssystem der Laborflasche mit Septum und Kanüle konnte einzig mit MgCO_3 eine effiziente Bernsteinsäureproduktion demonstriert werden, weshalb alle weiteren Kultivierungen mit dieser Carbonatquelle fortgeführt wurden.

4.2.9 Einfluss des Substrates

4.2.9.1 Einfluss der Initial-Glycerinkonzentration

Um eine Substrat-Inhibierung ausschließen zu können, wurde die Initial-Glycerinkonzentration näher untersucht. Dazu wurde die Initial-Glycerinkonzentration zwischen 50 und 125 g/L variiert und jeweils identische Mengen an MgCO_3 verwendet. In Abbildung 44 sind die Verläufe für die Bernsteinsäure- und Glycerinkonzentration sowie für den pH-Wert dargestellt.

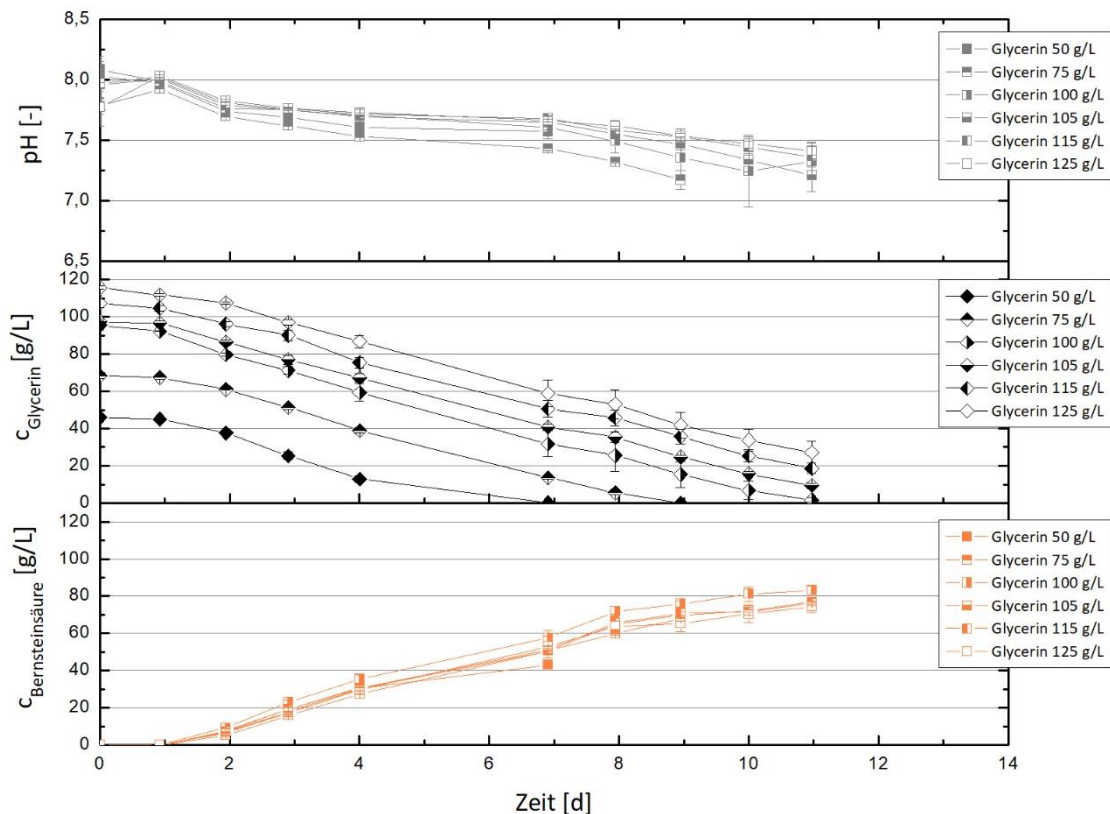


Abbildung 44: Einfluss der Initial-Glycerinkonzentration auf die Produktkonzentration und den pH-Wert der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit variabler Glycerin-Konzentration zwischen 50 und 100 g/L und identischer MgCO_3 -Konzentration, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Abbildung 44 zeigt, dass bei identischen Mengen an Glycerin und Magnesiumcarbonat der pH-Wert über den gesamten Kultivierungsverlauf von 11 Tagen stabil zwischen pH 8 und 7 gehalten werden konnte. Die Bernsteinsäurekonzentration stieg trotz variierender Glycerinkonzentrationen an und resultierte nach 11-tägiger Kultivierungsdauer in einer Konzentration von 70 bis 80 g/L. Da bei einer Initial-Glycerinkonzentration von 50 g/L die eingesetzte Menge bereits nach 7 Tagen vollständig aufgebraucht war, resultierte die Bernsteinsäurekonzentration in einem Wert von $43 \pm 0,4$ g/L. Durch die fehlende Probenahme zwischen Tag 4 und 7 der Kultivierung wäre der vollständige Verzehr des Substrates bereits nach 5 Tagen eingetreten. Ein komplettes Aufbrauchen der eingesetzten Glycerinmengen wurde ebenso bei 75 g/L nach 9 Tagen und bei 100 g/L nach 11 Tagen verzeichnet. Der parallele Substratverlauf der übrigen Kultivierungen ließ vermuten, dass das Glycerin nach 12, 13 und 14 Tagen bei den Initial-Konzentrationen von 105, 115 und 125 g/L aufgebraucht gewesen wäre.

Bei Betrachtung von Ertragskoeffizient und Produktivität nach Aufbrauchen des Substrats bzw. spätestens nach 11 Tagen der Kultivierung (Abbildung 45), zeigte sich, dass die Werte nur marginal variierten. Der Ertragskoeffizient betrug etwa $0,94 \pm 0,03$ g/g, die Produktivität bezogen auf den gesamten Prozess etwa $0,29 \pm 0,02$ g/(L·h) und die maximale Produktivität etwa $0,51 \pm 0,05$ g/(L·h).

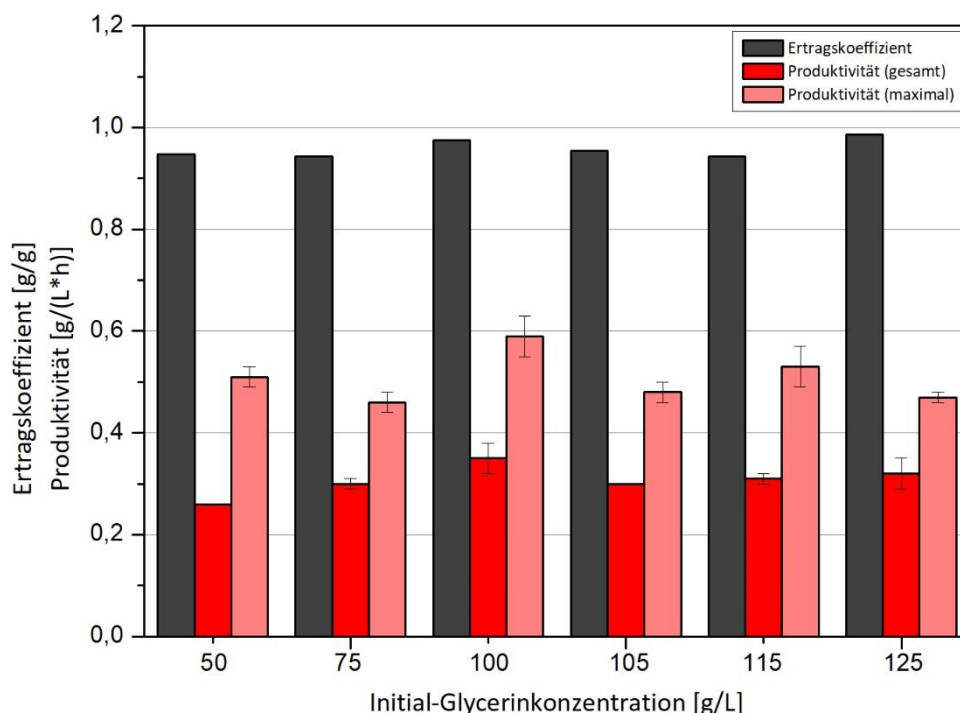


Abbildung 45: Einfluss der Initial-Glycerinkonzentration auf Ertragskoeffizient und Produktivität der Mischkultur DSM 32268 nach vollständigem Aufbrauchen von Glycerin bzw. 11 Tagen Kultivierungsdauer, Standardproduktionsmedium mit variabler Pharmaglycerin-Konzentration zwischen 50 und 100 g/L und identischer MgCO_3 -Konzentration, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Sowohl eine Substrathemmung durch erhöhte Konzentrationen von Glycerin im Medium als auch eine Hemmung durch entstehende Bernsteinsäure in der Kulturbrühe wurde nicht festgestellt. Solange der Mischkultur DSM 32268 ausreichend Medienbestandteile vorlagen, konnte die Bernsteinsäureproduktion in Laborflaschen mit Septum und Kanüle effizient ablaufen.

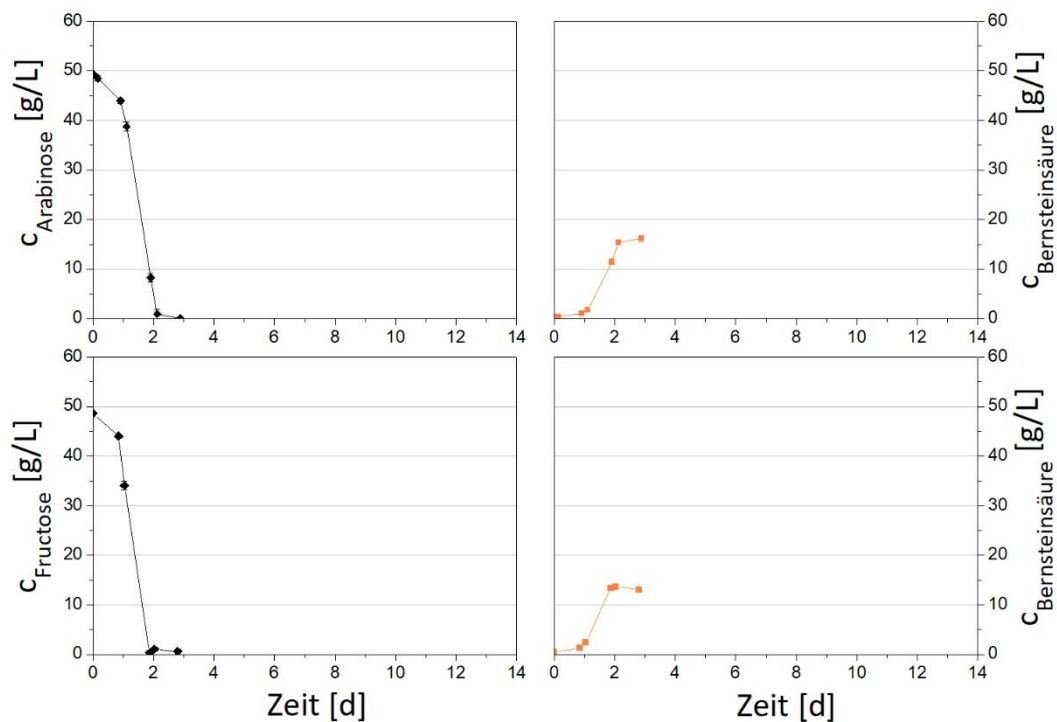
4.2.9.2 Fähigkeit zur Verwertung von alternativen Substraten

Die Mischkultur DSM 32268 ist in der Lage Glycerin zu Bernsteinsäure umzusetzen. Neben Glycerin wurden verschiedene Mono- und Disaccharide sowie der Zuckeralkohol Sorbit und das Anion der Gluconsäure, Gluconat, für die Bernsteinsäureproduktion in Betracht gezogen.

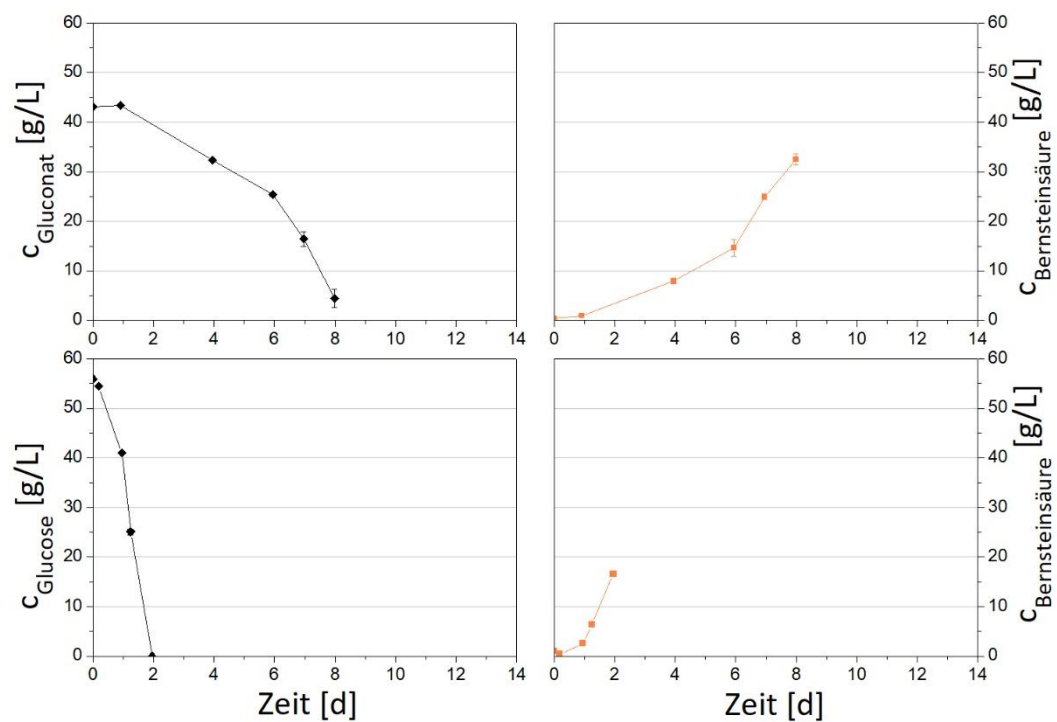
Hierbei geht es vor allem um alternative Substrate, die nativ in den zu untersuchenden Reststoffen enthalten sind. Dazu zählen unter anderem Saccharose (C12), Fructose (C6) oder Lactose (C12). Weitere Zucker, die durch Hydrolyse von Reststoffen gewonnen werden können, sind Xylose (C5), Arabinose (C5) und Mannose (C6). Der Zuckeralkohol Sorbit (C6) sowie Gluconat (C6), in Form von Na-D-Gluconat, wurden zusätzlich als Kohlenstoffquellen verwendet. Vor allem hinsichtlich ihrer Oxidationsstufen gelten Sorbit und Gluconat als interessante Substrate. Dabei sollte die Möglichkeit untersucht werden, die Verfügbarkeit von NADH und das NADH/NAD⁺-Verhältnis zu erhöhen und so die Verteilung der Metaboliten in der Mischkultur DSM 32268 zu bestimmen ⁴⁰. Die verschiedenen Substrate wurden jeweils in einer Anfangskonzentration von 50 g/L verwendet.

In Abbildung 46 a-e ist der Kultivierungsverlauf der Mischkultur DSM 32268 auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen dargestellt. Dabei wurde die Bernsteinsäure- und Substratkonzentrationen über die Kultivierungsdauer aufgetragen.

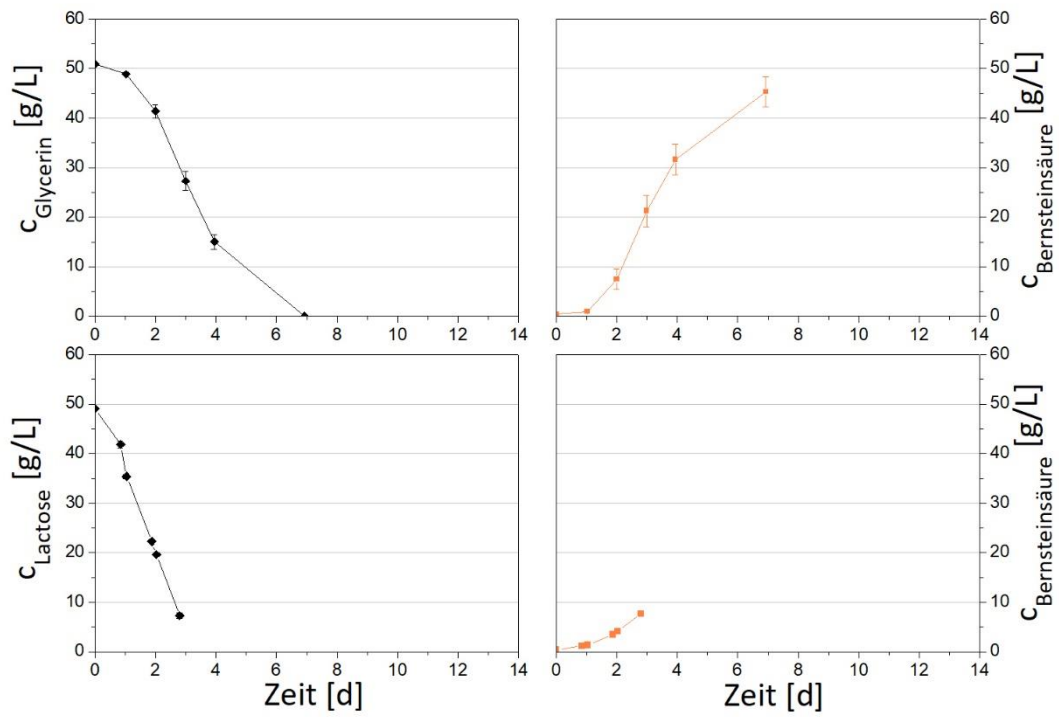
a



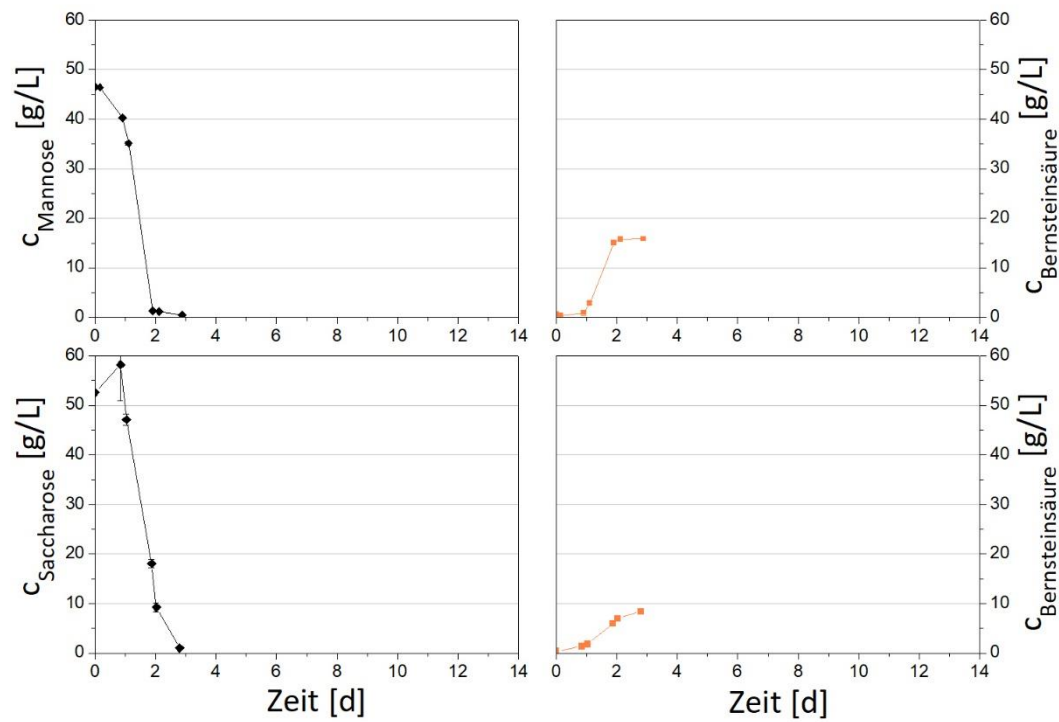
b



c



d



e

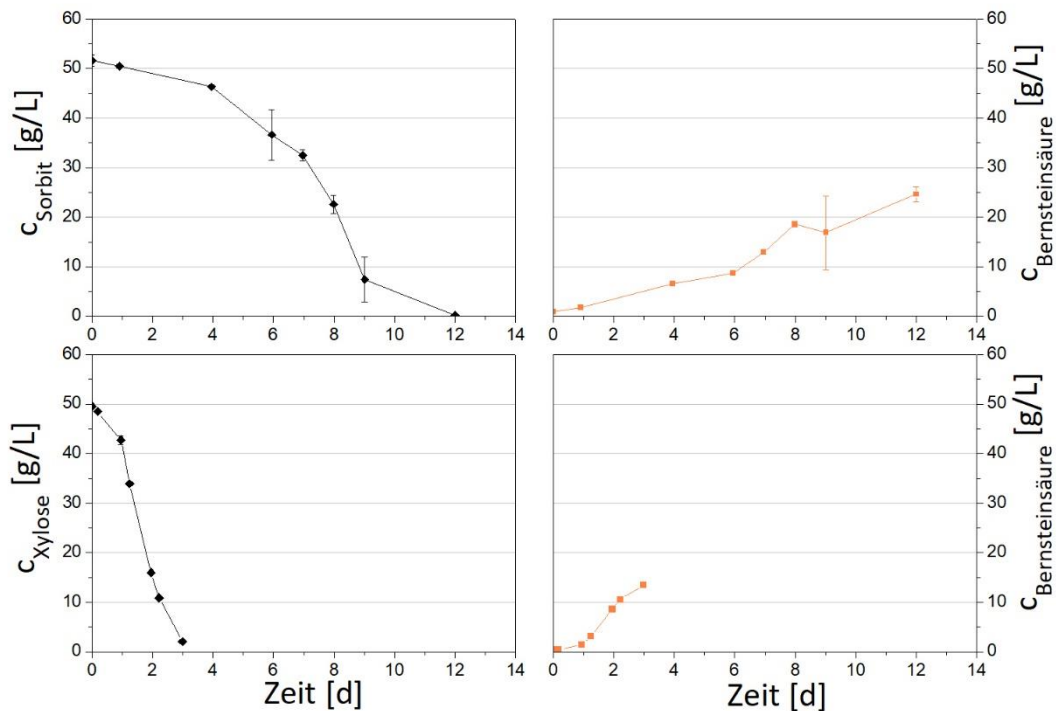


Abbildung 46: Kultivierungsverlauf in Bezug auf Substratverbrauch und Produktbildung (Bernsteinsäure) für a: L-Arabinose und D-Fructose, b: Na-D-Gluconat und D-Glucose, c: Glycerin und D-Lactose, d: D-Mannose und Saccharose, e: D-Sorbit und D-Xylose, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U: 150 rpm, eingesetzte Substrat- und MgCO₃-Konzentration: 50 g/L

Bis auf die Substrate Glycerin, Gluconat und Sorbit wurden die Mono- und Disaccharide innerhalb von 2 bis 3 Tage vollständig aufgebraucht. Glycerin war nach 7 tägiger Kultivierungsdauer vollständig verzehrt. Dem Diagramm (Abbildung 46 c) ist allerdings zu entnehmen, dass bei einer Probenahme nach 5 Tagen dies bereits der Fall gewesen wäre. So auch bei Sorbit, eine zusätzliche Probenahme zum Zeitpunkt t = 10 Tage hätte die vollständige Verwertung aufgezeigt. Die wesentlich schnellere Verwertung der Mono- und Disaccharide hatte allerdings nicht zur Folge, dass das eingesetzte Substrat komplett zu Bernsteinsäure umgesetzt wurde. Des Weiteren wird deutlich, dass mit Glycerin die höchste Bernsteinsäurekonzentration mit einem Wert von $45,3 \pm 3,1$ g/L erzielt wurde.

Abbildung 47 zeigt den prozentualen Anteil der gebildeten Produkte Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure und Essigsäure aus den verwendeten Kohlenstoffquellen.

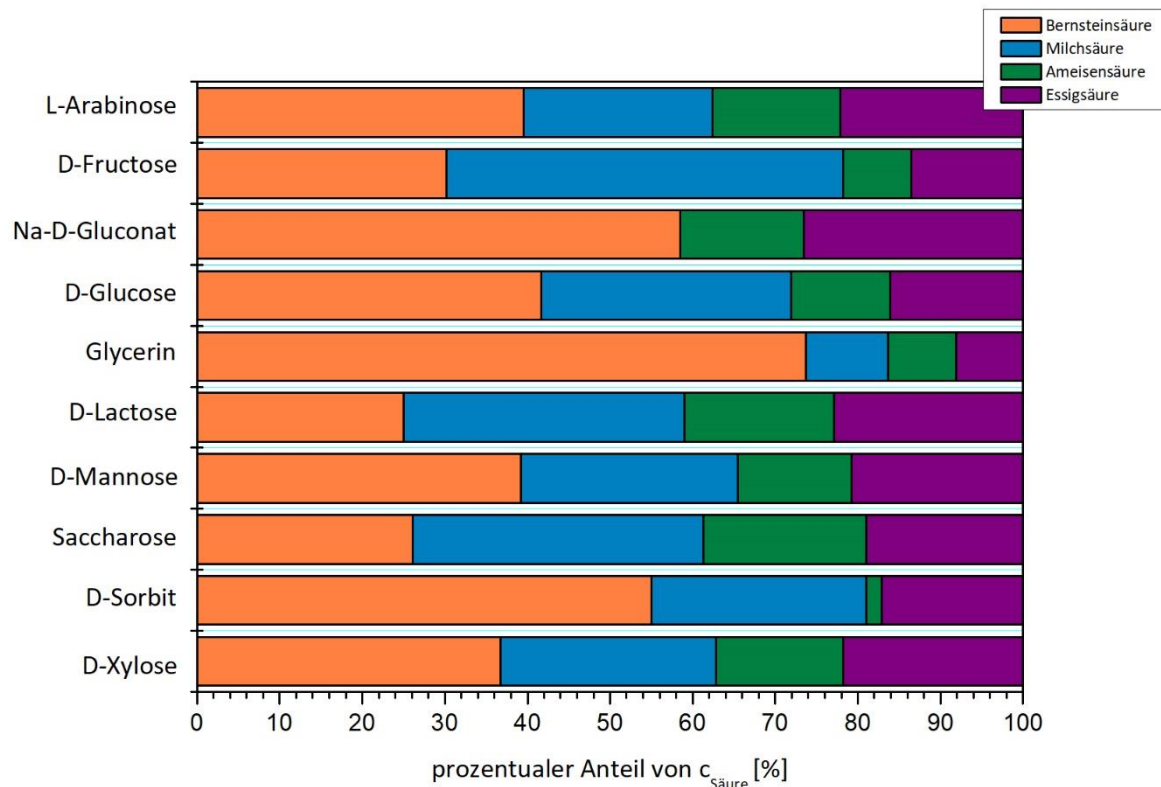


Abbildung 47: Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Substratquellen im Vergleich zu Glycerin, Darstellung der Produkte und Nebenprodukte (Milch-, Ameisen- und Essigsäure), eingesetzte Substratkonzentration: 50 g/L, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L MgCO_3 , Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Die Mischkultur DSM 32268 war in der Lage, die verschiedenen Kohlenstoffquellen zu Bernsteinsäure umzusetzen. Allerdings wird deutlich, dass aus Glycerin der höchste Bernsteinsäureanteil resultierte, dagegen mit Lactose und Saccharose die geringsten Werte erzielt wurden. Ausschlaggebend für die geringe Umsetzung könnte in der Struktur der Zucker liegen. Beides sind Disaccharide, während Lactose aus Galactose und Glucose besteht, setzt sich Saccharose aus Glucose und Fructose zusammen. Für eine effizientere Bernsteinsäurebildung sollte eine Spaltung in die Einfachzucker vorangeschoben werden. Bei Betrachtung von Arabinose, Glucose, Mannose und Xylose, wurde deutlich, dass die Zucker zu etwa 40 % zu Bernsteinsäure umgesetzt wurden. Dabei schien es unerheblich, ob es sich um Pentosen oder Hexosen handelte. Auch die Verteilung der übrigen Nebenprodukte, wie Milchsäure (ca. 30 %), Ameisensäure (ca. 15 %) und Essigsäure (ca. 20 %) war nahezu identisch. Allerdings haben die Zuckerarten Gluconat und Sorbit das Potential, für die biotechnologische Bernsteinsäureproduktion berücksichtigt zu werden. Vor allem bei Gluconat fiel auf, dass keine Milchsäure entstand, welche bei allen anderen Kohlenstoffquellen gebildet wurde, dafür jedoch ein erhöhter Anteil an Essigsäure. In beiden Fällen, sowohl bei Sorbit wie auch bei Gluconat, ist zu über 50 % Bernsteinsäure hervorgegangen.

Die vorherige Verwendung der jeweiligen Kohlenstoffquellen in der Zwischenkultur könnte zur vorzeitigen Anpassung der Stoffwechselwege der Mischkultur DSM 32268 und somit zur besseren Verstoffwechselung zu Bernsteinsäure führen. In diesem Experiment wurde die Zwischenkultur allerdings auf Glycerin kultiviert, da die Versuchsreihe nur einen ersten Überblick verschaffen sollte. Die Aufsummierung der gebildeten Säuren ergab im Vergleich zu den Substraten (Abbildung 67 im Anhang) Glycerin und Gluconat, dass etwa 5 g/L mehr als die eingesetzte Menge von 50 g/L gebildet wurde. Im Fall von Sorbit wurde insgesamt nahezu genauso viel gebildet (ca. 45 g/L) wie initial an Substrat verwendet wurde, mit einer Gesamtmenge an Produkten von 43 g/L ist dies auch annähernd bei Fructose herauszustellen. Bei den übrigen Zuckern wurde eine Gesamtmenge von etwa 30 bis maximal 40 g/L im Vergleich zum Substrat detektiert. Der Verlust zwischen eingesetzter und produzierter Menge wird daher in den Aufbau von Biomasse geflossen sein.

Zusätzlich zur Betrachtung der Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Substratquellen, wurde der Einfluss von Cofaktoren in Betracht gezogen. Cofaktoren haben wichtige Funktionen bei der Produktion verschiedener Fermentationsprodukte. Das Cofaktor-Paar NADH und NAD⁺ besitzt im mikrobiologischen Stoffwechselweg eine zentrale Bedeutung. Wird eine Kohlenstoffquelle, wie Glucose, unter Verwendung von NAD⁺ oxidiert, entstehen Reduktionsäquivalente in Form von NADH. Für das Zellwachstum ist die Oxidation von NADH zu NAD⁺ unerlässlich, zudem wird dabei ein Redox-Gleichgewicht erreicht. Der Stoffwechselweg zu Bernsteinsäure benötigt NADH für seine Synthese. Durch die Wahl der Kohlenstoffquelle mit verschiedenen Oxidationszahlen könnte eine Manipulation der Cofaktoren vorgenommen werden^{40,49,76}. Das Verhältnis von NADH/NAD⁺ beziehungsweise die Verfügbarkeit von NADH im Kultivierungsprozess wurde dabei nicht bestimmt. Für diese Betrachtung wurden Sorbit, Glucose, Gluconat und Glycerin herangezogen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Gegenüberstellung von Ertragskoeffizient ($Y_{P/S}$), Produktivität (P) und Produkte (Bernsteinsäure BS, Milchsäure MS, Ameisensäure AS, Essigsäure ES) von Sorbit, Glucose, Gluconat und Glycerin

	Sorbit	Glucose	Gluconat	Glycerin
$Y_{P/S}$ [g/g]	0,39	0,30	0,85	1,00
P_{ges} [g/(L·h)]	0,08	0,33	0,17	0,29
P_{max} [g/(L·h)]	0,23	0,60	0,43	0,48
BS-Titer [g/L]	24,6 ± 1,5	16,6 ± 0,3	32,5 ± 1,1	45,3 ± 3,1
MS [g/L]	11,7 ± 1,8	12,1 ± 0,3	-	6,7 ± 0,9
AS [g/L]	0,8 ± 0,03	4,8 ± 0,3	8,3 ± 0,4	5,6 ± 0,5
ES [g/L]	7,7 ± 1,4	6,4 ± 0,2	14,8 ± 0,4	5,5 ± 0,4
BS/ES	3,2	2,6	2,2	8,2
BS/AS	30,8	3,5	3,9	8,1
BS/MS	2,1	1,4	-	6,8
BS: Bernsteinsäure MS: Milchsäure AS: Ameisensäure ES: Essigsäure P_{ges}: Produktivität gesamt P_{max}: Produktivität maximal $Y_{P/S}$: Ertragskoeffizient				

Der Vergleich zwischen Sorbit, Glucose, Gluconat und Glycerin, die hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Oxidationsstufen betrachtet wurden, zeigte, dass mit Glycerin der höchste Bernsteinsäure-Endtiter wie auch der höchste Ertragskoeffizient erzielt wurde. Dagegen wurden mit Glucose die geringsten Werte hervorgebracht. Ein Grund dafür ist, dass die Bernsteinsäureproduktion aus Glucose nur einen einzigen NADH-Generierungsschritt einschließt, den von Glucose-6-phosphat zu Phosphoenolpyruvat (PEP), wobei aus 1 mol Glucose 2 mol NADH entstehen. Im weiteren Verlauf gibt es mehrere NADH verbrauchende Schritte. Im bernsteinsäurebildenden C4-Weg (TCA-Zyklus) werden insgesamt 4 mol NADH für die Schritte von Oxalacetat zu Malat und von Fumarat zu Succinat benötigt. In den nebenproduktbildenden C3-Wegen, bedarf dagegen die Bildung von Ethanol und Lactat jeweils 2 NADH. Folglich ist der Bedarf an NADH größer als dessen Bildung. Mehr Reduktionsäquivalente in Form von NADH werden allerdings bei Sorbit und Glycerin, im Vergleich zu Glucose, gebildet⁴⁰. Obwohl beide Substrate die gleiche Oxidationsstufe besitzen, wurde von der Mischkultur DSM 32268 bei Sorbit weniger Bernsteinsäure, dafür mehr Milch- und Essigsäure gebildet. Im Fall von Gluconat wird wiederum weniger NADH produziert, da jedes Molekül direkt zu PEP umgesetzt

und dadurch der NADH-bildende Schritt in der Glykolyse übergangen wird ⁴⁰. Letztlich stellte auch das höhere Bernsteinsäure/Essigsäure-Verhältnis bei Glycerin (8,2) und Sorbit (3,2) heraus, dass höher reduzierte Kohlenstoffquellen reduzierte Bedingungen schufen. So wurde mit Gluconat zwar die im Vergleich zweithöchste Bernsteinsäureendkonzentration von 32,5 g/L erzielt, folglich resultierte jedoch eine erhöhte Essigsäurebildung, wie auch Li, 2010 in seinen Arbeiten konstatierte ⁴⁰. Werden Substrate mit unterschiedlichen Oxidationsstufen verwendet, verteilt der Mikroorganismus sein Fermentationsmuster neu, um ein Redox-Gleichgewicht zu erreichen.

Zusätzlich wurde die Morphologie der Mischkultur DSM 32268 während der Kultivierungen auf den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen nach 2- bzw. 4-tägiger Kultivierungsdauer betrachtet und in Abbildung 48 dargestellt.

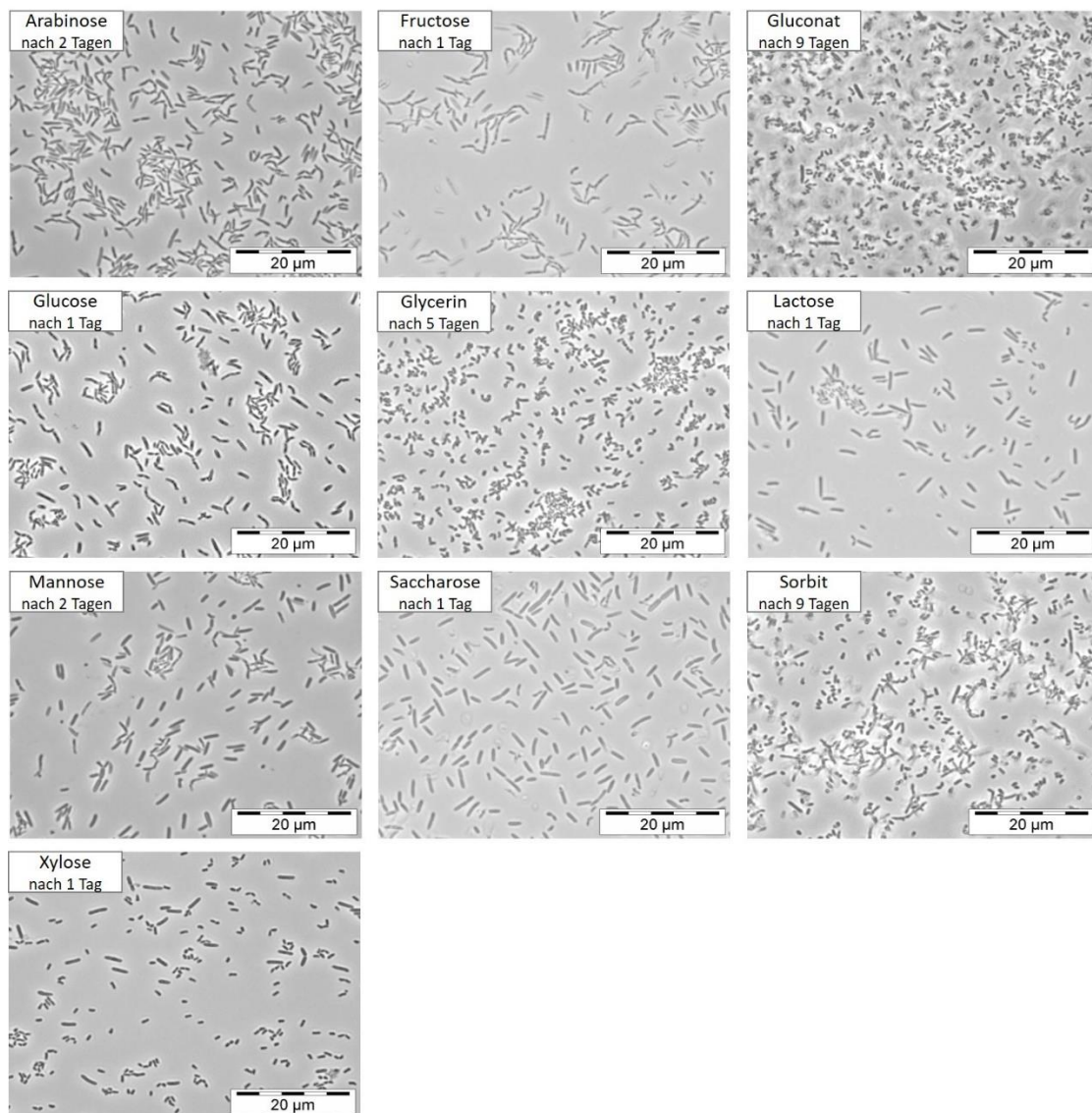


Abbildung 48: Mikroskopische Aufnahmen der Mischkultur DSM 32268 bei Verwertung der unterschiedlichen Substratquellen auf Standardproduktionsmedium mit MgCO_3 , Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Bei Verwendung von Gluconat und Sorbit als Substrat wurde deutlich, dass sich die Zellen der Mischkultur DSM 32268, wie beim Modellsubstrat Glycerin, während der Produktion von Bernsteinsäure deutlich verkleinerten. Bei den übrigen Substraten schien aufgrund der geringen Bernsteinsäurebildung kaum eine morphologische Änderung zum Ausgangszustand der Zellen aufzutreten. Einzig bei Fructose waren Verzweigungen der Zellen, üblich für Actinomyces, zu erkennen.

4.2.9.3 Fähigkeit zur Verwertung von Rohglycerin

Glycerin in Pharmaqualität, kurz Pharmaglycerin, stellte in allen Kultivierungen das Modellsubstrat dar. Daher sollte untersucht werden, inwieweit die Mischkultur DSM 32268 dazu befähigt ist, auch Rohglycerin zu verwerten. Die verwendeten Rohglycerine der Chargen K501 und K602 wurden von Biopetrol Schwarzheide GmbH (Deutschland) bezogen. Die Zusammensetzung der beiden Rohglycerine ist dem Kapitel 3.1 zu entnehmen.

Zunächst wurde eine Glycerinkonzentration von 50 g/L eingesetzt. Bis auf den Einsatz der Rohglycerine wurde die Zusammensetzung des Standardproduktionsmedium (3.3.4) in den Laborflaschen mit Septum und Kanüle unverändert gelassen. Als Puffersystem und zusätzliche CO₂-Quelle diente weiterhin MgCO₃ mit einer identischen Konzentration zu Glycerin. Die Rohglycerine wurden ohne weitere Aufarbeitung direkt für die Kultivierungen eingesetzt. Der Verlauf der Optischen Dichte der unterschiedlichen Glycerine (Abbildung 49) zeigte für die lag-Phase bis zum Tag 2 der Kultivierung einen nahezu identischen Verlauf.

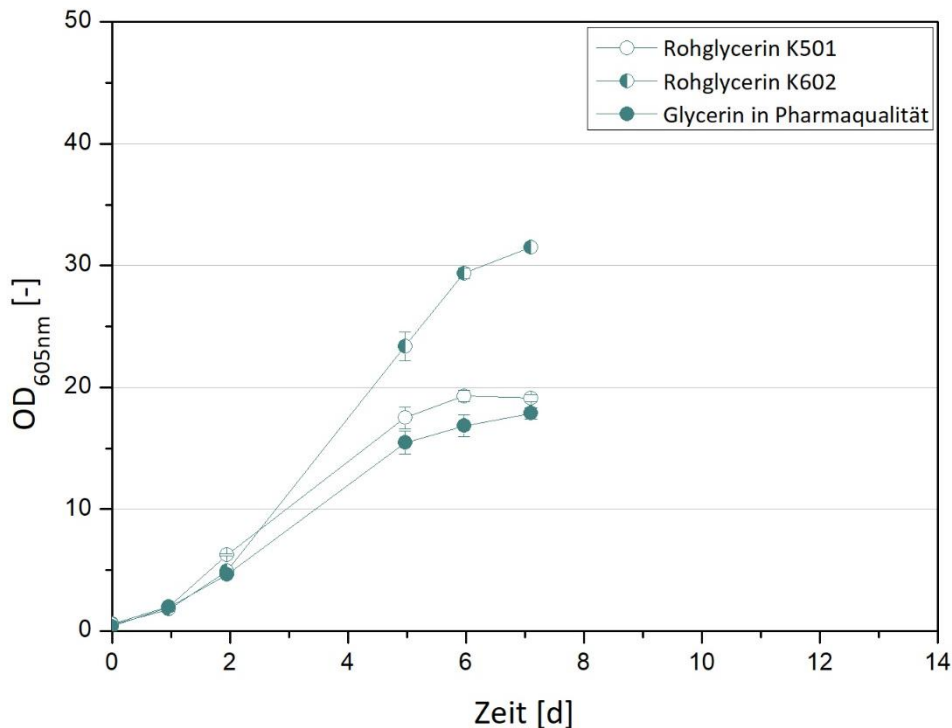


Abbildung 49: Verlauf der Optischen Dichte während der Kultivierung auf Rohglycerinen K501 und K602 sowie Glycerin in Pharmaqualität in 100 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L, Kultivierungsdauer: 7 Tage, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm

Nach 7 Tagen Kultivierung resultierte eine $\text{OD}_{605\text{nm}}$ von $19,1 \pm 0,3$ für das Rohglycerin K501 und eine $\text{OD}_{605\text{nm}}$ von $17,9 \pm 0,5$ für das Glycerin in Pharmaqualität. Während ab Tag 2 der Kultivierung eine stärkere Trübung der Kulturbrühe mit dem Rohglycerin K602 festgestellt wurde. Die Optische Dichte ergab einen Maximalwert von $\text{OD}_{605\text{nm}}$ 31,5. Aufgrund der wachstumsgekoppelten Produktion für diesen Prozess spiegelte sich der Unterschied in den Endwerten der Optischen Dichte auch im Bernsteinsäure-Titer (Abbildung 50) wider. Die Kultivierung auf Rohglycerin K501 resultierte in einer Bernsteinsäure-Endkonzentration von $40 \pm 1,3$ g/L und damit nahezu identisch mit dem Endwert für die Kultivierung auf Glycerin in Pharmaqualität ($38,1 \pm 1,6$ g/L). Hingegen wurde mit dem Rohglycerin K602 ein Bernsteinsäuremenge von $45,6 \pm 1,1$ g/L erzielt. Sowohl die Rohglycerine wie auch das Glycerin in Pharmaqualität wurden nach 7-tägiger Kultivierungsdauer komplett von der Mischkultur DSM 322268 verbraucht.

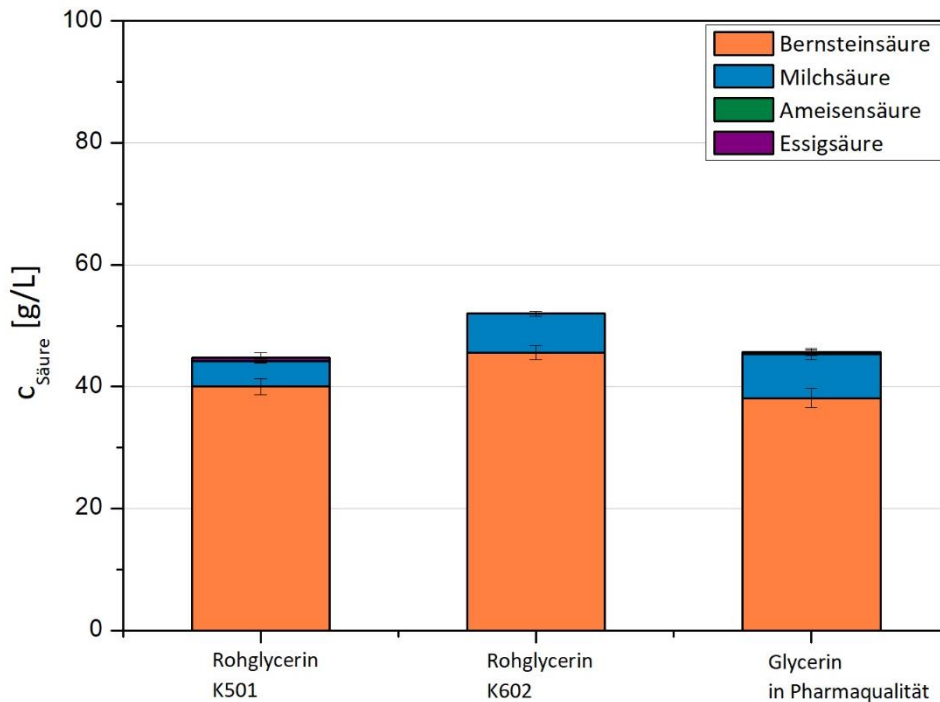


Abbildung 50: Kultivierung in 100 mL Laborflaschen mit Kanüle und Septum auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 im Vergleich zu Pharmaglycerin, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L, Kultivierungs-dauer: 7 Tage, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm

Die Kultivierung auf Rohglycerin K501 brachte eine geringere Milchsäurekonzentration von $4,2 \pm 0,3$ g/L hervor, während mit Pharmaglycerin $7,2 \pm 0,8$ g/L und mit Rohglycerin K602 $6,4 \pm 0,4$ g/L Milchsäure gebildet wurde. Weitere Nebenprodukte wie Ameisen- und Essigsäure wurden im Fall vom Rohglycerin K602 nicht gebildet, mit den beiden anderen Glycerinarten nur zu sehr geringen Konzentrationen.

Eine Inhibierung durch mögliche Hemmstoffe im Rohglycerin ließ sich bei einer eingesetzten Konzentration von 50 g/L Glycerin nicht erkennen. Auch hinsichtlich der Morphologie wurden keine Unterschiede bei den Zellformen ausgemacht (Abbildung 51). Die Zellen ähnelten sich in ihrer Größe, mit einer Länge von etwa 1,5 μm und einer Breite von 0,5 μm .

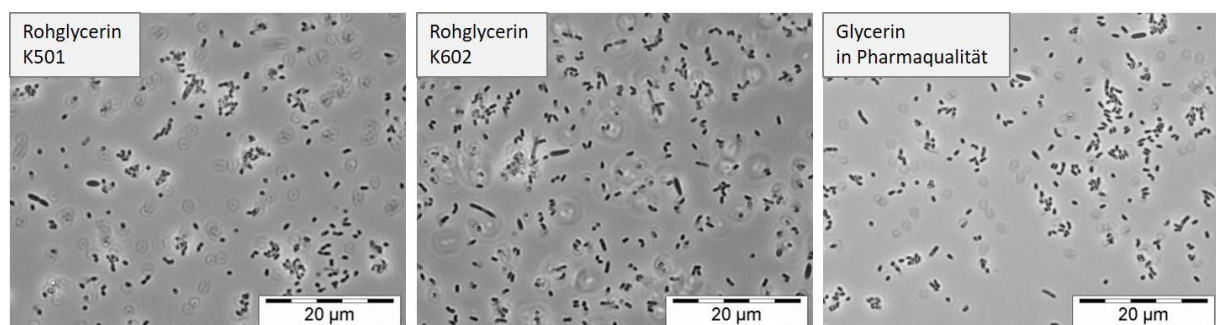


Abbildung 51: Mikroskopische Aufnahme zur Morphologie der Zellen bei den Kultivierungen mit Rohglycerin (K501 und K602) und Pharmaglycerin nach 5 Tagen Kultivierungsdauer, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3

Der Ertragskoeffizient sowie die Produktivität, gesamt wie auch maximal, unterschieden sich bei den Rohglycerinen und dem Pharmaglycerin nur minimal (Abbildung 52). Wurde bei der Kultivierung mit dem Rohglycerin K501 ein Ertragskoeffizient von $0,95 \pm 0,03$ g/g erreicht, konnte beim Rohglycerin K602 und Pharmaglycerin ein Wert von $0,89$ g/g erzielt werden. Dagegen konnte mit dem Rohglycerin der Charge K602 die höchste maximale Produktivität von $0,4 \pm 0,03$ g/(L·h) hervorgebracht werden.

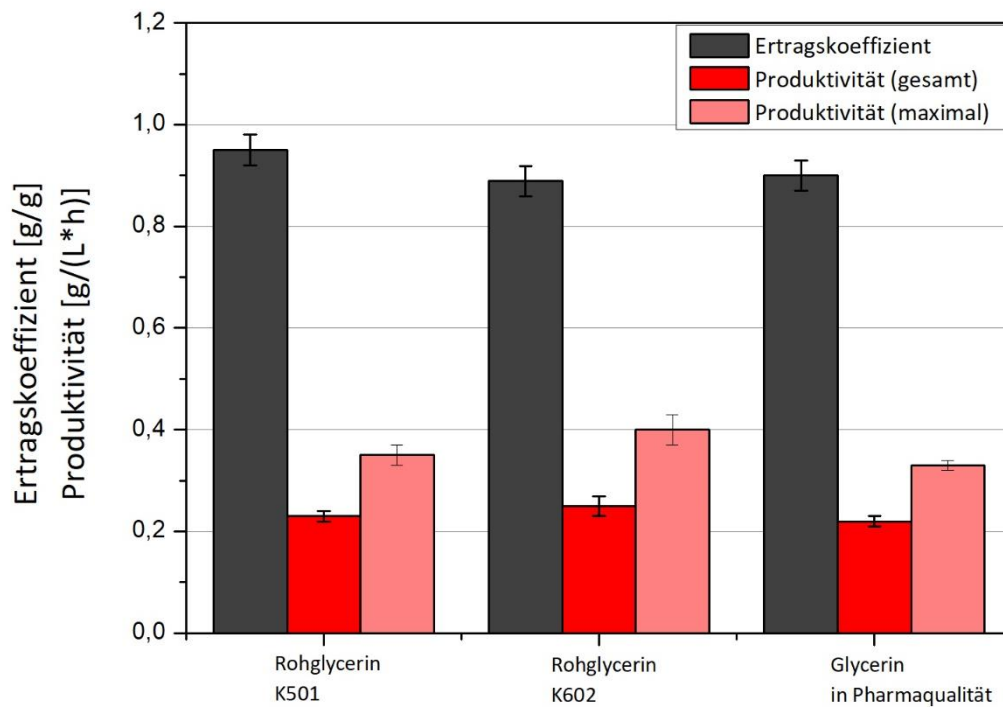


Abbildung 52: Ertragskoeffizient und Produktivität der Kultivierungen auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 sowie Glycerin in Pharmaqualität, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L, Kultivierungsdauer: 7 Tage, 100 mL Laborflasche mit Kanüle und Septum, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm

Bisher wurde aufgezeigt, dass die Mischkultur DSM 32268 auch Glycerinkonzentrationen von 100 g/L verwerten konnte. Um mögliche Hemmstoffe im Rohglycerin identifizieren zu können, wurde eine Glycerinkonzentration von 100 g/L bei den nachfolgenden Kultivierungen in Laborflaschen eingesetzt (Abbildung 53 und Abbildung 54).

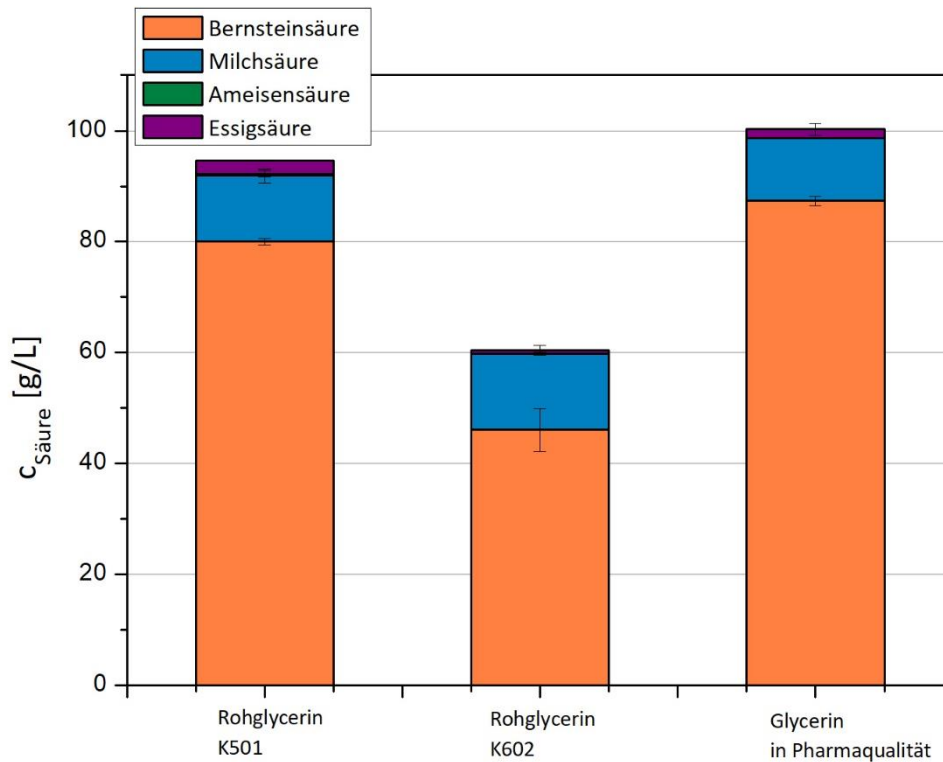


Abbildung 53: Kultivierung in 100 mL Laborflaschen mit Kanüle und Septum auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 im Vergleich zu Pharmaglycerin, eingesetzte Glycerinkonzentration: 100 g/L, Kultivierungsdauer: 14 Tage, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm

Bei einer eingesetzten Glycerinkonzentration von 100 g/L waren zwischen dem Pharmaglycerin und dem Rohglycerin K501 kaum Unterschiede im Produktspektrum wie auch beim Ertragskoeffizienten und bei der Produktivität auszumachen. Mit dem pharmazeutisch reinen Glycerin wurden minimal bessere Ergebnisse erzielt. Insgesamt belief sich die Nebenproduktkonzentration mit Pharmaglycerin auf $12,9 \pm 0,3$ g/L und die Bernsteinsäurekonzentration auf $87,3 \pm 0,8$ g/L, beim Rohglycerin K501 wurden $14,5 \pm 0,4$ g/L Nebenprodukte und $80 \pm 0,6$ g/L Bernsteinsäure erzeugt. Lediglich das Rohglycerin K602 unterschied sich wesentlich von den übrigen untersuchten Glycerinen. Dementsprechend wurde eine Bernsteinsäurekonzentration von $46,1 \pm 3,9$ g/L gebildet. Das Nebenproduktspektrum mit Milchsäure, Ameisensäure und Essigsäure blieb jedoch ähnlich. Die Nebenproduktkonzentration summierte sich auf einen Wert von 14,4 g/L. Während die Mischkultur DSM 32268 das Pharmaglycerin und das Rohglycerin K501 vollständig verstoffwechselte, verblieb beim Rohglycerin K602 eine Rest-Konzentration von $43,7 \pm 4,1$ g/L nach 14-tägiger Kultivierungsdauer.

Ausschlaggebend für die verminderte Bernsteinsäurebildung beim Rohglycerin K602 könnte die veränderte Zusammensetzung im Vergleich zum eingesetzten Rohglycerin der Charge K501 sein. Die Charge K602 wurde nach Umstellung des Prozesses entnommen. Zur Kostensenkung wurde das Kaliummethyllat durch Natriummethyllat ersetzt.

Die Ansäuerung des Rohglycerins erfolgte durch Salzsäure, was eine drastische Erhöhung des Chlorid-Gehaltes zur Folge hatte. Dieser könnte möglicherweise zu einer Inhibierung der Produktbildung geführt haben.

Die geringere Produktkonzentration spiegelte sich auch im Ertragskoeffizienten und in der Produktivität wider, dargestellt in Abbildung 54.

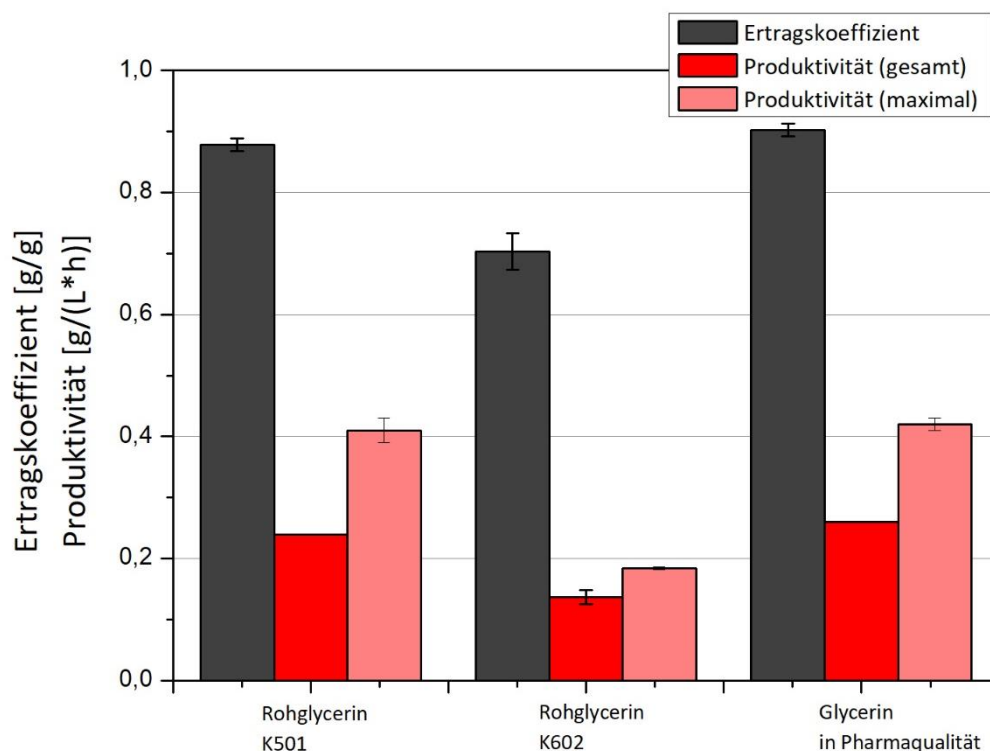


Abbildung 54: Ertragskoeffizient und Produktivität der Kultivierungen auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 sowie Pharmaglycerin, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 100 g/L, Kultivierungsdauer: 14 Tage, 100 mL Laborflasche mit Kanüle und Septum, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm

Im Vergleich zum Rohglycerin der Charge K501 ($Y_{P/S} = 0,88 \pm 0,01$ g/g) und zum Pharmaglycerin ($Y_{P/S} = 0,90 \pm 0,01$ g/g) wurde mit dem Rohglycerin K602 lediglich ein Ertragskoeffizient von $0,70 \pm 0,03$ g/g erzielt. Die Produktivität, bezogen auf den Gesamtprozess, belief sich für das Rohglycerin K602 auf einen Wert von $P = 0,14 \pm 0,01$ g/(L·h), die maximale Produktivität ist mit $0,18$ g/(L·h) anzugeben. Dagegen resultierte bei den anderen beiden Glycerinen die Produktivität bei $0,24$ g/(L·h) für K501 und $0,26$ g/(L·h) für das Pharmaglycerin. Die maximale Produktivität erreichte dabei einen Wert von $0,4 \pm 0,02$ g/(L·h).

Zusammenfassend wurde herausgestellt, dass die Mischkultur DSM 32268 in der Lage war, Rohglycerin mit einer Konzentration von 100 g/L zu Bernsteinsäure umzusetzen. Mit dem Rohglycerin der Charge K501 wurden sogar annähernd gleiche Werte erzielt, welche aus der Kultivierung mit Pharmaglycerin resultierten. Damit wird deutlich, dass eine Aufarbeitung des Roh-

glycerins nicht notwendig ist, so denn die Zusammensetzung keine inhibierenden oder toxischen Stoffe für den Mikroorganismus enthält, wie es beispielsweise bei der Charge K602 der Fall war. Grundsätzlich würden durch die Verwendung von Rohglycerin enorme Prozesskosten eingespart werden, sofern nicht Probleme bei der Aufarbeitung der Bernsteinsäure auftreten.

4.3 Entwicklung eines definierten Produktionsmediums

Alle Versuche zur Entwicklung eines definierten Produktionsmediums wurden in Laborflaschen mit Septum und Kanüle mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL bei 32 °C, 150 rpm und für etwa 14 Tage Kulturdauer durchgeführt.

4.3.1 Variation der einzelnen Medienkomponenten

Für die Produktion der gewünschten organischen Säure Bernsteinsäure wurde das Standardproduktionsmedium, wie in Kapitel 3.3.4 dargestellt, verwendet.

Es sollte untersucht werden, inwiefern die Medienkomponenten Di-Kaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Ammoniumsulfat, Calciumchlorid-Dihydrat und Magnesiumchlorid bei variierenden Konzentrationen Einfluss auf die Produktbildung nehmen (Abbildung 55).

Der Variationsbereich der einzelnen Medienkomponenten ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Variationsbereich der Konzentrationen der einzelnen Medienkomponenten im Standardproduktionsmedium, fett gedruckt ist die Standardkonzentration

Substanz	Variationsbereich der einzelnen Medienkomponenten				
K₂HPO₄ [g/L]	0	0,75	1,5	3	5
MgCl₂ [g/L]	0	0,025	0,05	0,094	0,2
CaCl₂·2H₂O [g/L]	0	0,15	0,265	0,5	0,75
(NH₄)₂SO₄ [g/L]	0	0,5	1	1,5	3
NaCl [g/L]	0	0,5	1	1,5	3

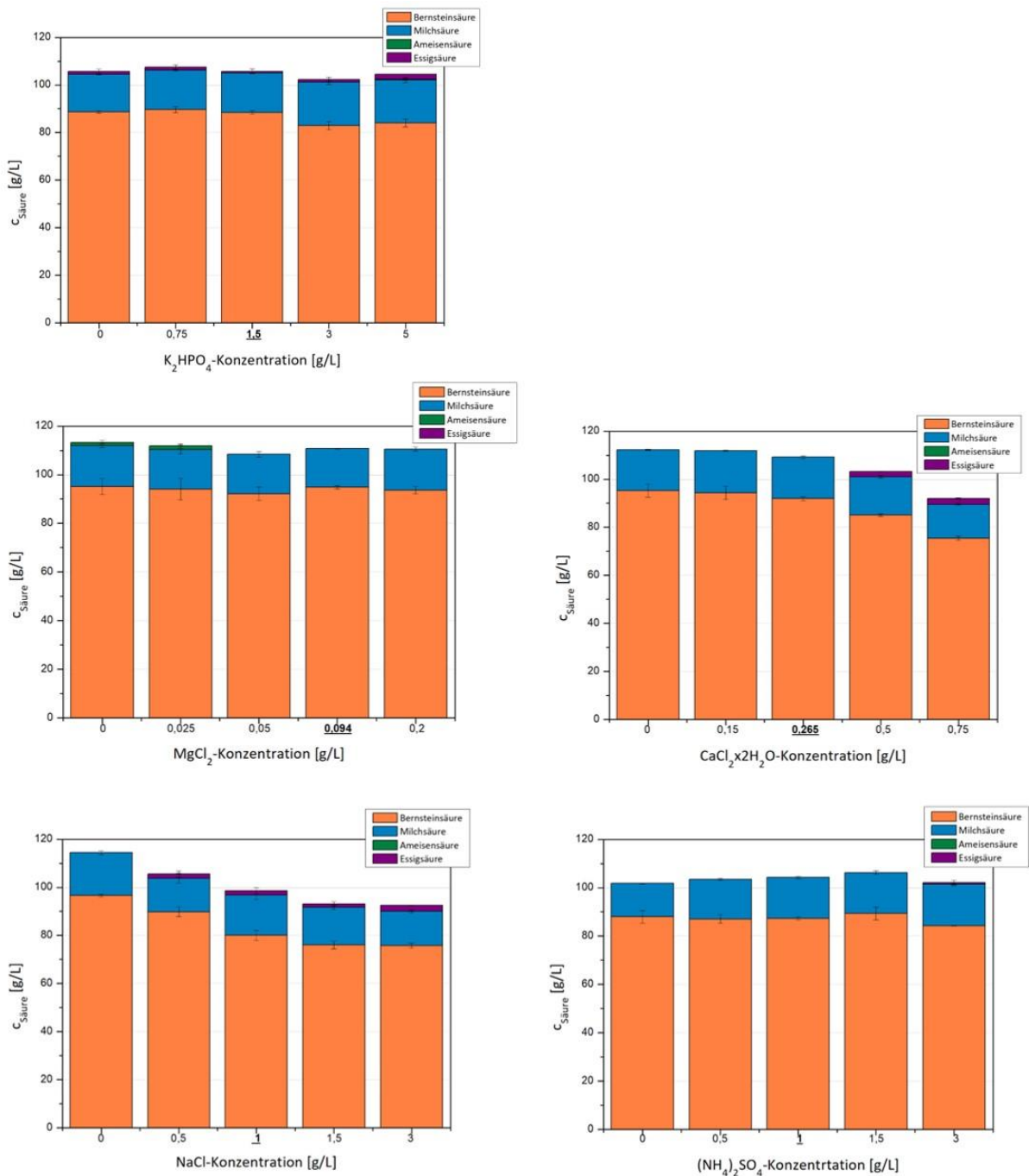


Abbildung 55: Einfluss der Variation der Konzentration ausgewählter Medienkomponenten auf die Produktbildung, unterstrichene fett formatierte Konzentration ist die im Standardproduktionsmedium vorliegende Konzentration, Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage

Einzig bei den Medienkomponenten Natrium- und Calciumchlorid wurde deutlich, dass bei steigender Konzentration im Medium die Menge an gebildeter Bernsteinsäure sank. Dagegen wurde Essigsäure vermehrt gebildet, während Milchsäure weiterhin mit konstanter Konzentration produziert wurde.

Diese Versuchsreihe verdeutlichte, dass vermutlich Chlorid ab einer Konzentration von mehr als 0,5 g/L einen negativen Einfluss auf die Produktbildung der Bernsteinsäure hatte.

Dass es bei Magnesiumchlorid nicht zu einer Senkung der Bernsteinsäureproduktion kam, lag in der zu geringen maximalen Konzentrationsvariation von nur maximal 0,2 g/L. Wie bereits in Kapitel 4.2.9.3 dargestellt, führte eine erhöhte Chloridkonzentration zur Reduzierung der Bildung von Bernsteinsäure in der Mischkultur DSM 32268.

Neben Chlorid könnte auch das Natrium-Ion bei NaCl ausschlaggebend für die verminderte Bernsteinsäurebildung gewesen sein. Das Natrium-Ion spielt eine bedeutende Rolle bei der Nährstoffaufnahme und ist ebenso ein wichtiger Wachstumsfaktor. Natrium-Ionen sind verantwortlich für die Ausbildung des transmembranen pH-Gradienten, der Zellbeweglichkeit (Motilität) und der intrazellulären pH-Regulierung⁷⁴. Ferner wurde bei Betrachtung des Zellwachstums für die NaCl-Variation herausgestellt, dass eine Zunahme der NaCl-Konzentration in einer Abnahme der Optischen Dichte resultierte (Abbildung 68 im Anhang). Zusätzlich wurde damit verdeutlicht, dass es sich bei der Bernsteinsäureproduktion durch die Mischkultur DSM 32268 um einen wachstumsgekoppelten Prozess handelte, das bedeutete, dass bei geringerer Optischer Dichte auch die Bernsteinsäureproduktion reduziert wurde.

Im Weiteren wurde der Einfluss von Magnesiumchlorid untersucht. Das Magnesium-Ion spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der zellulären Stoffwechselwege und ist vor allem als Cofaktor für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, dem Schlüsselenzym der Bernsteinsäurebildung, von Bedeutung. Die Variation der Magnesiumkonzentration lieferte keine wesentlichen Auswirkungen auf die Bernsteinsäureproduktion. Bei allen Konzentrationsstufen wurden zwischen 92 g/L und 95 g/L Bernsteinsäure gebildet. Auch beim Nebenproduktspektrum sowie beim Zellwachstum wurden keine Unterschiede ausgemacht.

Die geringen Auswirkungen auf das Produktspektrum der Mischkultur DSM 32268 sind möglicherweise auf steten Einsatz von Hefeextrakt und Trypton/Pepton im Medium zurückzuführen. Die Komplexmedienbestandteile könnten jegliche Effekte überdeckt haben. Im Folgenden wurde daher eine Hefeextrakt-Pepton-Kombinatorik detailliert untersucht.

4.3.2 Hefeextrakt-Pepton-Kombinatorik

Hefeextrakt sowie Trypton/Pepton aus Casein (im Weiteren nur noch als Trypton bezeichnet) sind teure Medienkomponenten im Vergleich zum Produkt. Hefeextrakt enthält einen hohen Anteil an Proteinen (Peptiden), Aminosäuren und Vitaminen der B-Gruppe. Pepton ist ebenso ein Gemisch aus kurzkettigen Peptiden und Aminosäuren. Eine Reduzierung dieser komplexen Medienbestandteile beziehungsweise deren vollständiger Verzicht im Medium würde die Prozesskosten enorm senken.

Aufgrund dessen wurde untersucht, bei welcher Hefeextraktkonzentration die Mischkultur DSM 32268 in der Lage ist, auch fortwährend Bernsteinsäure zu produzieren und wie sich

diese Variationen auf das Nebenproduktspektrum auswirkten. Die Konzentration von Hefeextrakt wurde im Bereich von 0 g/L bis 15 g/L variiert (Abbildung 56), auf Trypton wurde dabei vollständig verzichtet.

In Abbildung 56 bedeuten die gestrichelten Linien, die Konzentrationen, die bei einer Kultivierung auf Standardproduktionsmedium mit je 5 g/L Hefeextrakt und Trypton erzielt beziehungsweise immer als Referenz mitgeführt wurden.

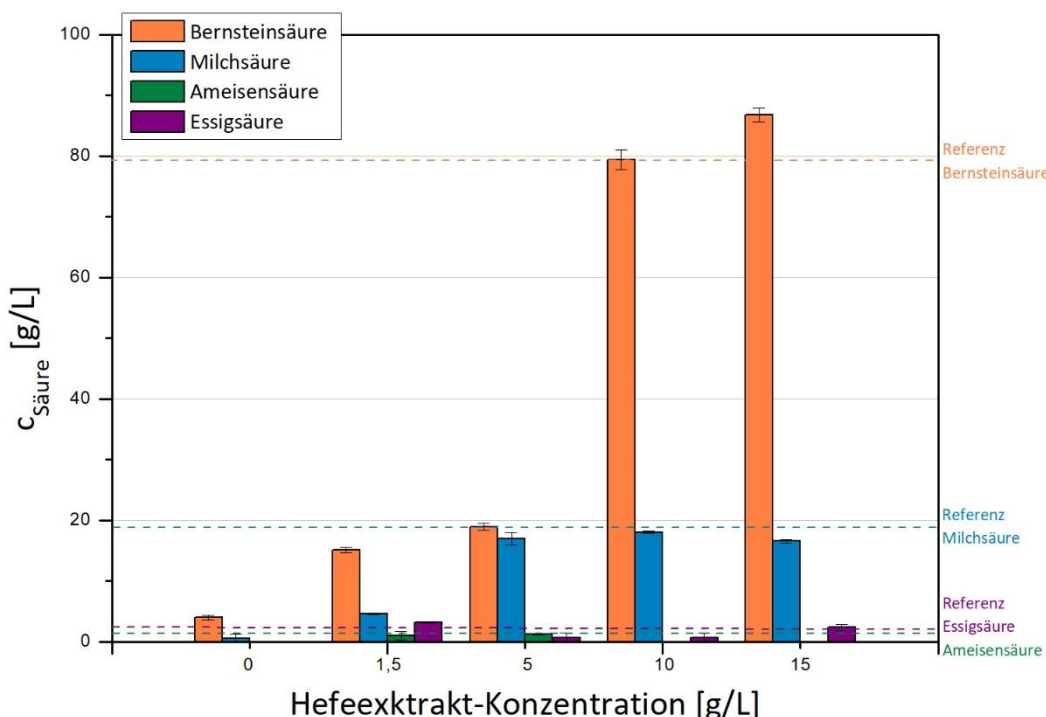


Abbildung 56: Produktkonzentrationen bei variierenden Hefeextraktkonzentrationen der Mischkultur DSM 32268, dabei Verzicht auf Trypton, Standard-Kultivierung (Referenz) mit Hefeextrakt 5 g/L und Trypton 5 g/L als gestrichelte Linie; Kultivierungsbedingungen: T 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, Kultivierungsdauer: 14 Tage

Es konnte herausgestellt werden, dass die Mischkultur DSM 32268 auch bei einer Hefeextraktkonzentration von 0 g/L geringe Mengen an Bernsteinsäure ($4,0 \pm 0,4$ g/L) bildete. Eine Steigerung der Hefeextraktmenge ging einher mit einem Anstieg in der Produktkonzentration, hauptsächlich von Bernsteinsäure, aber auch von Milchsäure. Eine Erhöhung von 5 g/L auf 10 g/L Hefeextrakt vervierfachte die Bernsteinsäurekonzentration von $18,9 \pm 0,6$ auf $79,4 \pm 1,6$ g/L. Eine weitere Erhöhung um 5 g/L auf insgesamt 15 g/L Hefeextrakt wirkte sich allerdings nur noch geringfügig kumulativ auf die Bernsteinsäurekonzentration ($86,8 \pm 1,2$ g/L) aus. Bei der Referenz-Kultivierung zeigte sich, dass Trypton ähnliche Auswirkungen auf die Produktbildung wie Hefeextrakt zu haben schien, da die Referenz identische Werte ($79,1 \pm 0,4$ g/L) zur Kultivierung mit 10 g/L Hefeextrakt hervorbrachte. Zurückzuführen war dies auf die ähnliche Zusammensetzung der beiden komplexen Medienbestandteile (Tabelle 17). Somit war es

möglich, Trypton in folgenden Kultivierungen wegzulassen und einzig mit Hefeextrakt als Komplexmedienbestandteil weiterzuarbeiten.

Tabelle 17: Typanalyse von Trypton/Pepton aus Casein (Roth) und Hefeextrakt (Merck Millipore) laut Hersteller

Typanalyse	Trypton/Pepton aus Casein	Hefeextrakt
Gesamtstickstoff	$\geq 10,0 \%$	$\geq 10,5 \%$
Trocknungsverlust	$\leq 6,0 \%$	$\leq 5,0 \%$
Asche	$\leq 15,0 \%$	$\leq 17,0 \%$
pH (2%ige Lösung)	6,5 – 7,5	5,5 – 7,2
Aminostickstoff	$\geq 3,9 \%$	k.A.

Aufgrund der wachstumsgekoppelten Produktion von Bernsteinsäure wies die Optische Dichte ein identisches Profil auf (Abbildung 69 im Anhang). Je mehr Hefeextrakt im Medium vorlag, desto höher war das Zellwachstum. Ab einer Hefeextrakt-Konzentration von 10 g/L lag die Optische Dichte bei $OD_{605nm} 30,8 \pm 0,5$. Mit 15 g/L Hefeextrakt wurde eine OD_{605nm} von $33,5 \pm 1,7$ nach 14-tägiger Kultivierungsdauer erzielt. Die OD_{605nm} -Werte der Referenz-Kultivierung ($OD_{605nm} 30,9 \pm 1,8$) entsprachen, ebenso wie beim Bernsteinsäure-Titer, denen der Kultivierung mit 10 g/L Hefeextrakt. Ferner glich auch der Substratverbrauch (Abbildung 70 im Anhang) dieser Verlaufscharakteristik. Je mehr Hefeextrakt eingesetzt wurde, desto schneller wurde das Substrat von der Mischkultur DSM 32268 verstoffwechselt. Ein vollständiger Umsatz beziehungsweise nahezu Komplettverbrauch wurde bei 10 g/L und 15 g/L sowie der Referenz realisiert.

Folglich wurde aufgezeigt, dass zwar auch ohne Hefeextrakt Produktbildung möglich ist, allerdings bei Erhöhung der Hefeextraktkonzentration die Bernsteinsäurebildung signifikant gesteigert wurde. Daraus resultierend, fungiert Hefeextrakt als bedeutende Stickstoffquelle ⁴⁹, die die Bernsteinsäureproduktion der Mischkultur DSM 32268 positiv beeinflusste. Vor allem Aminosäuren und Vitamine sind hierbei von zentraler Bedeutung. Hefeextrakt liefert wichtige Nährstoffe, ist aber ein großer Kostenfaktor in industriell relevanten Bioprozessen, wie zum Beispiel der Fermentation von Bernsteinsäure ⁴⁹.

4.3.3 Einfluss von Aminosäuren auf die Produktbildung

Für eine genauere Bestimmung der für die Produktbildung erforderlichen Aminosäuren wurde das in den Kultivierungen verwendete Hefeextrakt hinsichtlich der enthaltenen Aminosäuren analysiert. Es wurde zunächst eine Kultivierung mit 10 g/L Hefeextrakt, ohne Trypton/Pepton, durchgeführt, um den Anteil der im Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren zu definieren. In

Abbildung 57 ist die anteilige Menge der freien Aminosäuren, normiert auf 1, zum Zeitpunkt $t = 0$ d der Kultivierung dargestellt.

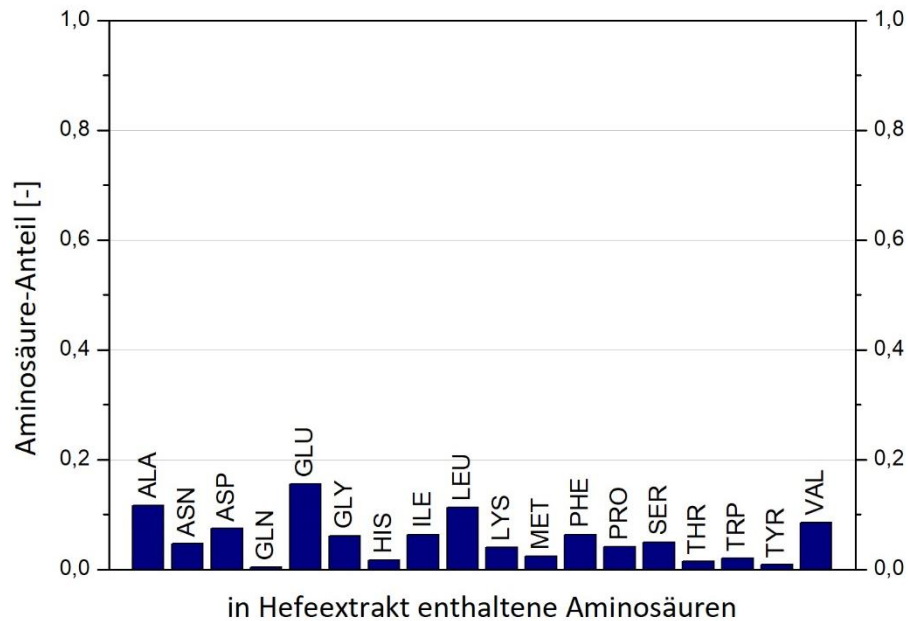


Abbildung 57: Absoluter Anteil der freien Aminosäuren zum Zeitpunkt $t = 0$ d der Kultivierung, die in 10 g/L Hefeextrakt enthalten sind, Überstand der Kultursuspension wurde derivatisiert und anschließend mittels GC-FID vermessen, Kultivierung in 100 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat, T: 32 °C, U: 150 rpm

Nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen auf Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und identischer Menge an Magnesiumcarbonat war das Substrat vollständig aufgebraucht. Die Bernsteinsäureproduktion kam zum Erliegen. Am Ende der Kultivierung wurde die Differenz zwischen der Aminosäuremenge zum Zeitpunkt 0 und nach 14 Tagen errechnet. In Abbildung 58 ist der prozentuale Anteil der verbrauchten Aminosäuren während der Standard-Kultivierung dargestellt.

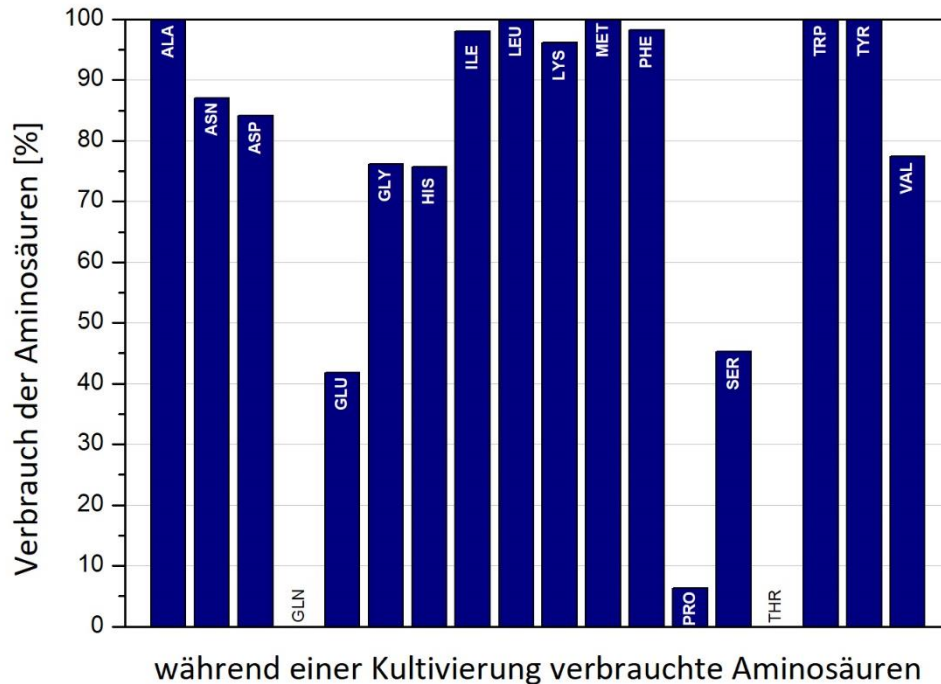


Abbildung 58: Prozentualer Verbrauch der in 10 g/L Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren während einer Kultivierung mit Standardproduktionsmedium auf 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat nach 14 Tagen Kultivierungsdauer, T: 32 °C, U: 150 rpm, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

Dabei bedeuteten 100 % den kompletten Verbrauch einer Aminosäure, was bei Alanin, Leucin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin der Fall war. Überdies wurde bei Isoleucin, Lysin und Phenylalanin ein nahezu restloses Aufbrauchen festgestellt. Während Glutamin und Threonin gar nicht verwertet wurden. Obwohl es teilweise zur vollständigen Verwertung einiger Aminosäuren kam, konnte an dieser Stelle keine Aussage darüber getroffen werden, welche Aminosäuren die Mischkultur DSM 32268 tatsächlich für die Bernsteinsäureproduktion einsetzte beziehungsweise welche sich positiv oder sogar inhibierend auswirkten.

Darauf aufbauend wurden alle im Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren in variierenden Konzentrationen einer Standard-Kultivierung mit 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat sowie 1,5 g/L Hefeextrakt supplementär hinzugefügt.

Abbildung 59 zeigt den Bernsteinsäure-Endtiter der jeweiligen Variation in Relation zur Standard-Kultivierung, also ohne zusätzliche Zugabe einer Aminosäure.

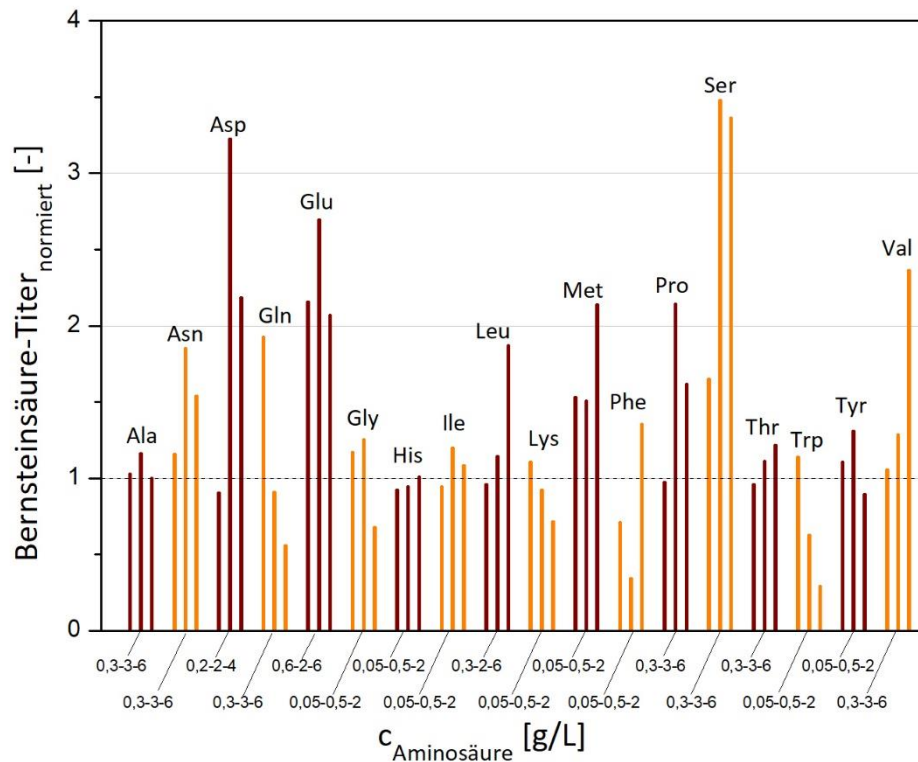


Abbildung 59: Supplementierung von Aminosäuren während einer Kultivierung auf je 100 g/L Glycerin und MgCO_3 sowie 1,5 g/L Hefeextrakt, normierter Bernsteinsäuretitel, gestrichelte Linie zeigt Bernsteinsäuretitel ohne Supplementierung einer Aminosäure und 1,5 g/L Hefeextrakt, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U: 150 rpm, Kultivierungsdauer: 14 Tage

Dabei wurde deutlich, dass vor allem durch die Zugabe von L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure und L-Serin eine bis zu 3-fache Steigerung der Bernsteinsäurekonzentration erzielt wurde. Verglichen mit einer Kultivierung bei der 10 g/L Hefeextrakt eingesetzt wurden, konnte durch die Supplementierung einer einzelnen Aminosäure zu 1,5 g/L Hefeextrakt allerdings nicht der Bernsteinsäureendtitel erreicht werden, der mit besagten 10 g/L resultierte. Durch die Zugabe von 3 g/L L-Serin konnte während der Kultivierung auf Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin sowie verminderter Hefeextraktkonzentration von 1,5 g/L nach 14 Tagen eine Bernsteinsäurekonzentration von 39,3 g/L erzielt werden, mit 10 g/L Hefeextrakt dagegen 89,5 g/L. Zusammenfassend wurde deutlich, dass nur durch das Zusammenspiel der untersuchten Aminosäuren eine effiziente Bernsteinsäureproduktion hervorgerufen werden konnte. Daher wurde im Weiteren ein Aminosäure-Mix eingesetzt, mit Konzentrationen, bei denen zuvor ein positiver Effekt auf die Bernsteinsäureproduktion herausgestellt wurde. In Tabelle 18 ist ein Überblick der eingesetzten Aminosäuren mit den jeweiligen Konzentrationen im Medium dargestellt.

Tabelle 18: Aminosäure-Mix mit optimalen Konzentrationen, die die Bernsteinsäureproduktion positiv beeinflusst haben

Aminosäure-Mix	Konzentration [g/L]
L-Alanin	3,0
L-Asparagin*	3,0
L-Asparaginsäure	2,0
L-Glutamin	0,3
L-Glutaminsäure	2,0
Glycin	0,5
L-Isoleucin	6,0
L-Leucin	6,0
L-Methionin	2,0
L-Phenylalanin	2,0
L-Prolin	1,5
L-Serin	3,0
L-Valin	6,0

* in Form von L-Asparaginmonohydrat

Für den folgenden Vergleich, dargestellt in Abbildung 60, wurde ein Minimalmedium mit 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat verwendet sowie ein Minimalmedium, versetzt mit einer geringen Menge Hefeextrakt (1,5 g/L). Diesen beiden Ansätzen wurde zudem der Aminosäure-Mix (Tabelle 18) beigelegt. Als Referenz diente ein Standardproduktionsmedium mit 10 g/L Hefeextrakt. Es wurden die Produktkonzentration der Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure und Essigsäure nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen aufgenommen.

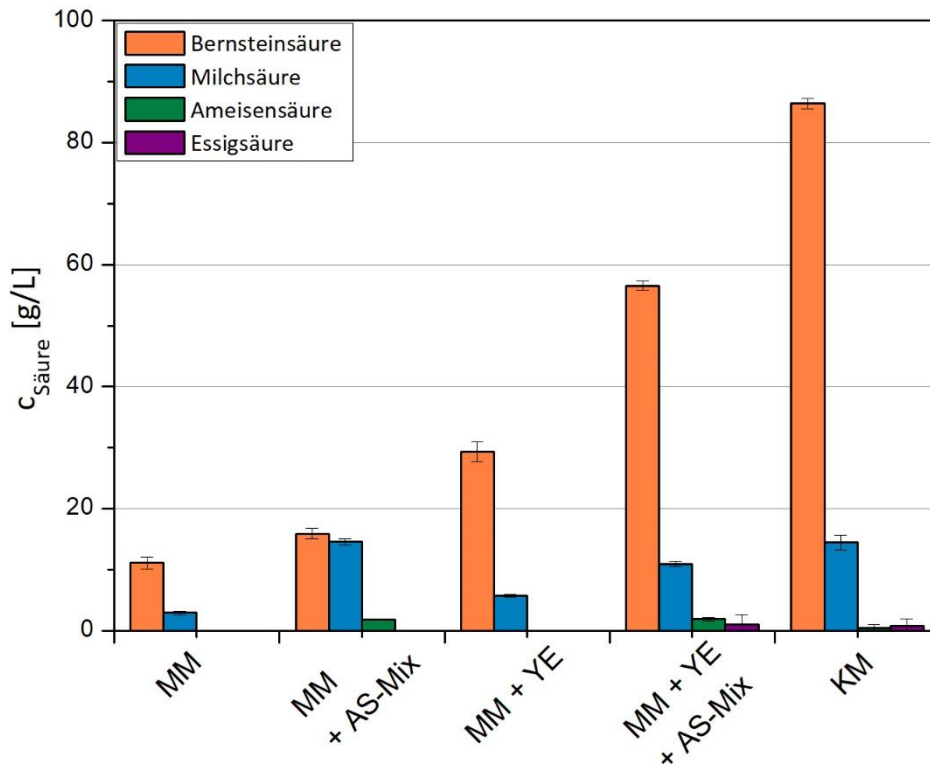


Abbildung 60: Vergleich der Produktkonzentrationen bei Kultivierung auf Minimalmedium (MM) (ohne und mit Hefeextrakt (MM+YE) mit einer Konzentration von 1,5 g/L) und Zugabe des Aminosäure-Mix (AS-Mix) (aus Tabelle 19) im Vergleich zu Komplexmedium (KM, Standardproduktionsmedium mit 10 g/L Hefeextrakt); Kultivierungsdauer: 14 Tage, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm

Wie bereits herausgestellt, war die Mischkultur DSM 32268 in der Lage, ohne Hefeextrakt und Trypton Bernsteinsäure ($11,1 \pm 0,9$ g/L) zu bilden. Dabei wurde eine Milchsäurekonzentration von $2,9 \pm 0,3$ g/L detektiert. Bei Zusatz von 1,5 g/L Hefeextrakt zum Minimalmedium (MM+YE) konnte die Bernsteinsäurekonzentration um nahezu das dreifache ($29,4 \pm 1,6$ g/L) gesteigert werden. Daneben wurden $5,8 \pm 0,2$ g/L Milchsäure produziert. Bei Zugabe des Aminosäure-Mix zum Minimalmedium (MM+AS-Mix), resultierte Bernsteinsäure in einer Menge von $15,9 \pm 0,9$ g/L bei vollständigem Verzicht auf Hefeextrakt. Allerdings wurde auch nahezu gleichviel Milchsäure ($14,6 \pm 0,6$ g/L) sowie eine geringe Konzentration an Ameisensäure ($1,8 \pm 0,1$ g/L) gebildet. Wurde das Minimalmedium mit dem Aminosäure-Mix zusätzlich mit Hefeextrakt (1,5 g/L) ergänzt (MM+YE+AS-Mix), wurde die Bernsteinsäurekonzentration abermals auf einen Wert von $56,6 \pm 0,8$ g/L gesteigert. Der eingesetzte Hefeextrakt bewirkte eine schnellere Verstoffwechselung des Substrats zum Produkt Bernsteinsäure. Zudem wurde die Menge an Milchsäure geringfügig auf $10,9 \pm 0,5$ g/L reduziert. Als weitere Nebenprodukte wurden Ameisensäure ($1,9 \pm 0,3$ g/L) und Essigsäure ($1,1 \pm 1,5$ g/L) gebildet. Eine Rest-Glycerinkonzentration von $27,2 \pm 0,3$ g/L war nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen vorhanden. Ein kompletter Verbrauch wäre möglicherweise nach 18 Tagen festgestellt worden und hätte in einer identischen Bernsteinsäurekonzentration von etwa 86 g/L resultiert, wie es auch im Fall

des Komplexmediums mit einer Bernsteinsäurekonzentration von $86,4 \pm 0,9$ g/L war, bei dem es sich um das Standardproduktionsmedium mit 10 g/L Hefeextrakt handelte. Hierbei wurde das eingesetzte Glycerin nach 14-tägiger Kultivierungsdauer nahezu vollständig aufgebraucht. Ein Ersatz des Hefeextrakts allein durch eine Mischung aus Aminosäuren schien damit also nicht möglich zu sein. Die Mischkultur DSM 32268 baute die Aminosäuren ab und setzte diese für die Bernsteinsäureproduktion ein, betrachtet man allerdings die eingesetzten Konzentrationen des Aminosäure-Mix, wird deutlich, dass dadurch keine Kostenersparnis zu erzielen sein wird.

4.3.4 Einfluss von Vitaminen auf die Produktbildung

Neben Aminosäuren ist Hefeextrakt auch reich an Vitaminen. In der folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluss der B-Vitamine auf die Bernsteinsäurebildung untersucht. Dabei handelte es sich um folgende Vitamine, die in ihrer Konzentration variiert wurden:

- Biotin (B₇)
- Folsäure (B₉)
- Nicotinsäure (B₃, Niacin)
- Ca-Pantothenat (B₅)
- Pyridoxin (B₆)
- Riboflavin (B₂)
- Thiamin (B₁)

Die Kultivierungen fanden in Laborflaschen mit Septum und Kanüle statt, wobei das Standardproduktionsmedium mit je 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat sowie 1,5 g/L Hefeextrakt eingesetzt wurde. Diesem wurden supplementär die B-Vitamine zugesetzt. Der Bernsteinsäuretitert der Standard-Kultivierung, dargestellt als gestrichelte Linie in Abbildung 61, wurde auf 1 normiert und in Relation zur Supplementierung der Vitamine gesetzt. Die Kultivierungsdauer betrug bei allen Variationen 14 Tage. Dabei bedeuten alle Werte über 1 eine Steigerung der Bernsteinsäurekonzentration im Vergleich zur Referenz (Standard-Kultivierung mit 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat sowie 1,5 g/L Hefeextrakt).

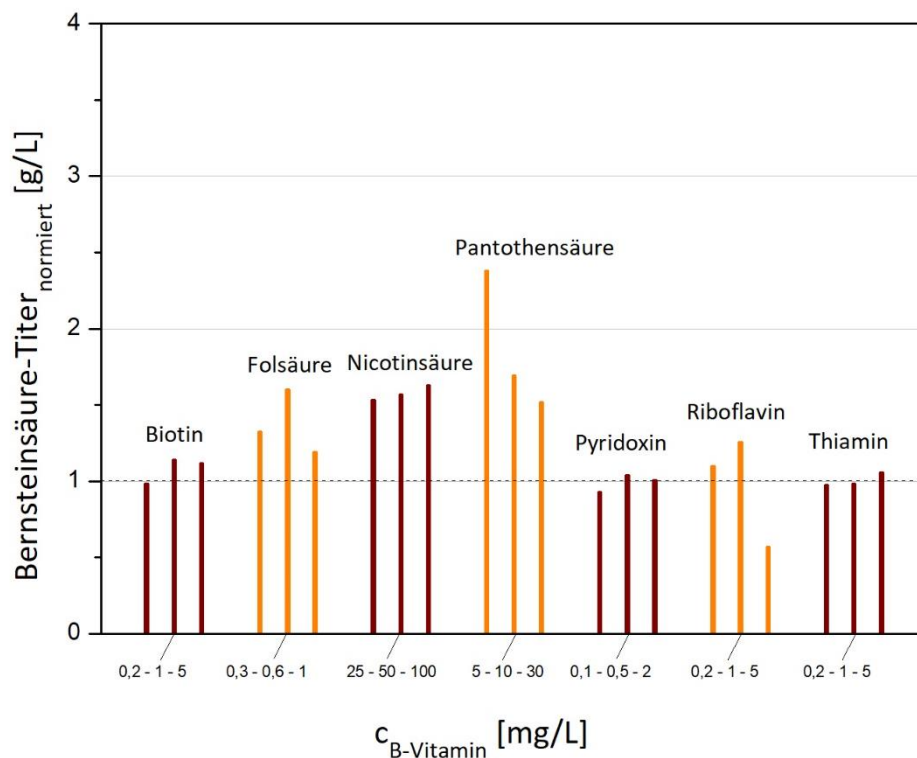


Abbildung 61: Supplementierung von B-Vitaminen während einer Kultivierung auf je 100 g/L Glycerin und MgCO_3 sowie 1,5 g/L Hefeextrakt, normierter Bernsteinsäuretitert, gestrichelte Linie stellt Bernsteinsäuretitert ohne Supplementierung von B-Vitaminen dar, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U: 150 rpm, Kultivierungsdauer: 14 Tage

Im Fall der B-Vitamine hatte die Zugabe von Folsäure bis zu einer Konzentration von 0,6 mg/L, von Nicotinsäure bis 100 mg/L sowie von Pantothersäure bis maximal 5 mg/L und von Riboflavin bis 1 mg/L einen positiven Einfluss auf die Bernsteinsäurebildung der Mischkultur DSM 32268. Bei zuletzt genanntem Vitamin ist zudem die höchste Bernsteinsäurekonzentration mit 34,3 g/L erzielt worden. Die Supplementierung von Pyridoxin, Thiamin und Biotin bewirkte nahezu keine Steigerung in der Produktbildung. Wenngleich Xi et al.⁷⁶ herausstellte, dass Biotinkonzentrationen im Bereich von 2 bis 10 mg/L in einem chemisch definierten Medium in einer Erhöhung der Bernsteinsäurekonzentration resultierten. Dabei fungiert Biotin zur Bereitstellung von Cytochrom b bei der Elektronentransportkette.

Jedoch muss auch hier herausgestellt werden, dass die Supplementierung der B-Vitamine in unterschiedlichen Konzentrationen und bei verringerter Hefeextraktkonzentration (1,5 g/L) nicht annähernd dem Bernsteinsäuretitert entsprach, der mit 10 g/L erbracht wurde. Die maximale Bernsteinsäurekonzentration, die bei Zugabe von 5 mg/L Pantothersäure resultierte, bedeutete gerade einmal 40 % des Titers einer Standard-Kultivierung und war somit nicht konkurrenzfähig.

Zusammenfassend haben die Aminosäuren und Vitamine einen entscheidenden Anteil an der effizienten Bernsteinsäureproduktion der Mischkultur DSM 32268, allerdings durch

Supplementierung oder Ersetzen einzelner Bestandteile konnte keine maßgebliche Steigerung der Bernsteinsäurebildung im Vergleich zur Verwendung des Komplexmedienbestandteils Hefeextrakt ausgemacht werden.

4.4 Immobilisierung der Mischkultur DSM 32268 in LentiKats®

Eine Immobilisierung der Zellen in LentiKats® wurde vorgenommen, um zum einen eine Produktivitätssteigerung der Bernsteinsäurebildung zu erzielen, zum anderen aber auch weil in den linsenförmigen Polyvinylalkohol-Formulierungen möglicherweise begünstigende Bedingungen hervorgebracht werden können, die eine mikroaerophile Produktion unterstützen und den *Paenibacillus*-Stamm von der Produktion ausschließen. In Abbildung 62 ist der Kultivierungsverlauf der freien Zellen im Vergleich zu den immobilisierten Zellen dargestellt.

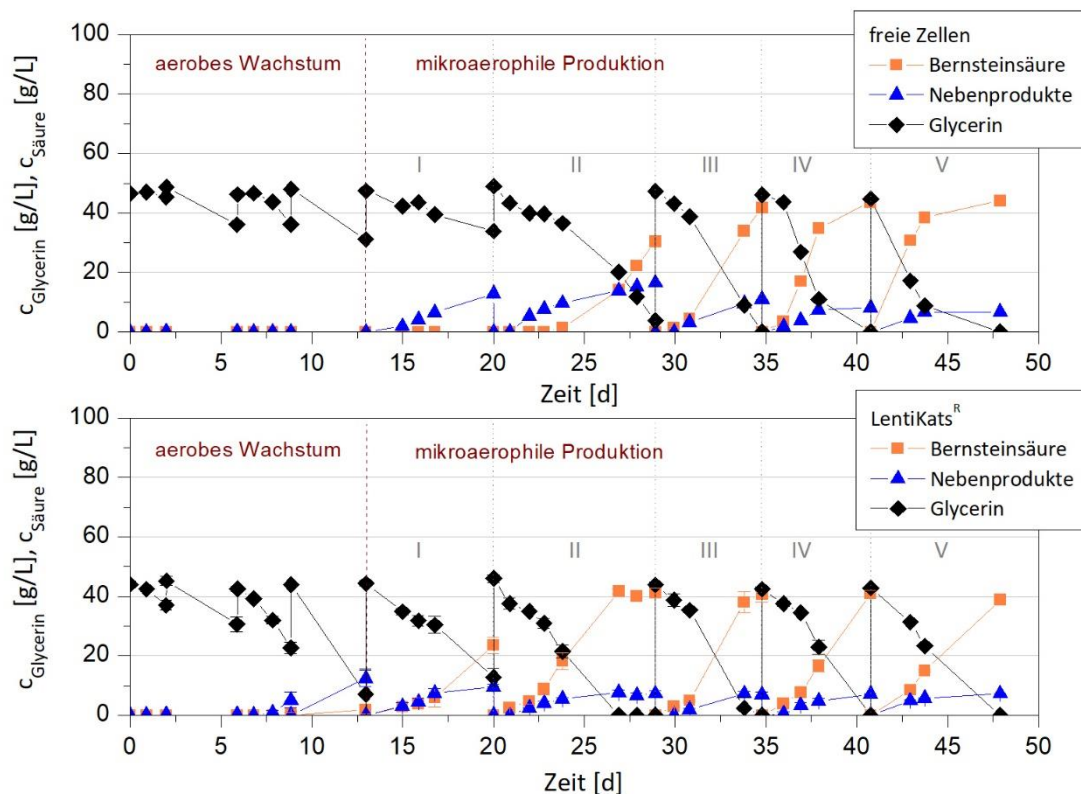


Abbildung 62: Vergleich der Substrat- und Produktkonzentration während der Kultivierungen von freien Zellen der Mischkultur DSM 32268 mit immobilisierten Zellen in LentiKats®, 2-phasige Kultivierung: aerobe Anzucht in 250 mL Schikanekolben, mikroaerophile Produktion in 250 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 100 mL, Medium: 50 g/L Glycerin und MgCO_3 , 10 g/L Hefeextrakt, kein Trypton/Pepton, Kultivierungsdauer: 48 Tage, T: 32 °C, U: 150 rpm

Über die Dauer der Kultivierung wurde der Substratverbrauch sowie die Produktbildung der freien und der immobilisierten Zellen aufgenommen. Die Kultivierung ist in zwei Phasen unterteilt, der aeroben Anzucht der Zellen in Schikanekolben (Nennvolumen: 250 mL,

Arbeitsvolumen: 100 mL) und der mikroaerophilen Produktion in Laborflaschen mit Septum und Kanüle, in Abbildung 62 als Zyklus I – V nummeriert. Im Intervall von einigen Tagen beziehungsweise spätestens, als das eingesetzte Glycerin nahezu aufgebraucht war, wurden die LentiKats® mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Fortführung der Kultivierung in frischem Medium. Sowohl für das aerobe Wachstum in Schikanekolben wie auch für die mikroaerophile Produktion in Laborflaschen wurde Standardproduktionsmedium mit einer Glycerin- und Magnesiumcarbonatkonzentration von je 50 g/L verwendet. Allerdings wurde die Hefeextraktmenge auf 10 g/L erhöht, dagegen auf Trypton verzichtet.

Wird die aerobe Phase der Kultivierung verglichen, wird deutlich, dass die freien Zellen bis Tag 13 zwar Glycerin verbrauchten, dieses aber nur für das Wachstum einsetzten. Die Bildung von Bernsteinsäure oder Nebenprodukten blieb aus. Indessen führte die Anzucht der immobilisierten Zellen dazu, dass am Tag neun der Kultivierung die Produktion von Milchsäure einsetzte. Nach 13 Tagen war das eingesetzte Glycerin nahezu aufgebraucht. Im Anschluss an das aerobe Wachstum im Schikanekolben wurden die LentiKats® erneut, wie nach jedem Zyklus, gewaschen. Zur mikroaerophilen Produktion wurden Laborflaschen (Nennvolumen: 250 mL, Arbeitsvolumen: 100 mL) mit Septum und Kanüle gewählt. Ein neuer Zyklus mit frischem Medium wurde nach etwa 5 Tagen begonnen, wobei das Substrat nahezu vollständig verwertet war. Mit den freien Zellen wurde ähnlich verfahren, allerdings wurden diese beim Übergang zur Produktionsphase nicht gewaschen. Als Inokulum dienten 2 mL der freien Zellen aus der aeroben Wachstumsphase beziehungsweise aus dem vorangegangenen Zyklus.

Zu Beginn der mikroaerophilen Produktion wird deutlich, dass die immobilisierten Zellen innerhalb von sieben Tagen Kultivierungsdauer das eingesetzte Glycerin in Bernsteinsäure (23,6 g/L) umgesetzt haben. Als Nebenprodukte, mit einer Gesamtmenge von 9,5 g/L, wurden hauptsächlich Milchsäure und zu einem geringen Anteil Ameisensäure detektiert. Im Gegensatz dazu konnten die freien Zellen das Glycerin im gleichen Zeitraum kaum verwerten. Es wurden ausschließlich Nebenprodukte mit einer Konzentration von 12,8 g/L gebildet, auch hier handelte es sich um Milchsäure und Ameisensäure. Zurückzuführen ist die geringe Verwertung des Substrats auf die aerobe Anzucht der Zellen. Spätere Analysen ergaben, dass bei der aeroben Kultivierung der Mischkultur DSM 32268 der bernsteinsäureproduzierende Mikroorganismus vom Stamm *Paenibacillus lautus* überwachsen wurde. Erst im folgenden Zyklus wurde das mikroaerophile Milieu, dass für die Produktion von Bernsteinsäure notwendig war, wiederhergestellt. Untermuert wurde dies anhand des Verlaufs der Optischen Dichte, dargestellt in Abbildung 63. Am Ende des ersten Zyklus der Produktionsphase erreichte die Optische Dichte nach sieben Tagen einen Maximalwert von OD_{605nm} 10. Im darauffolgenden Zyklus, wie auch in den folgenden, lag dieser Wert bei etwa OD_{605nm} 20.

Ergebnisse und Diskussion

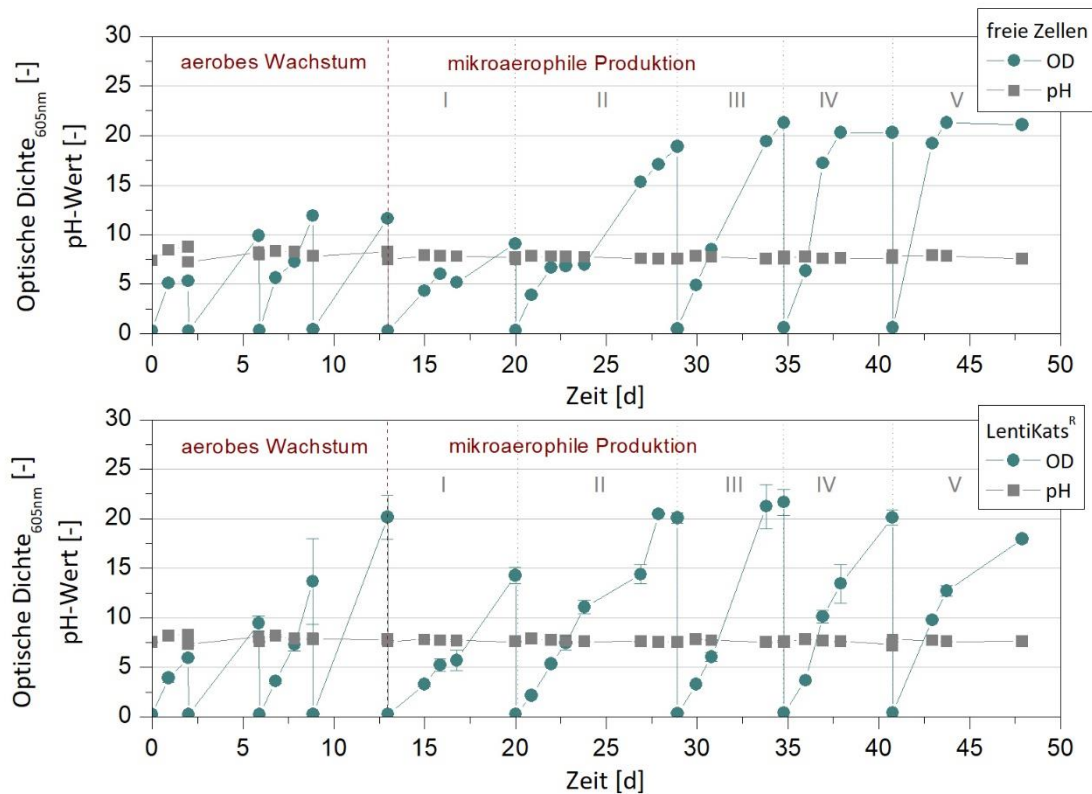


Abbildung 63: Vergleich des Zellwachstums und des pH-Wertes während der Kultivierungen von freien Zellen der Mischkultur DSM 32268 mit immobilisierten Zellen in LentiKats®, 2-phasige Kultivierung: aerobe Anzucht in 250 mL Schikanekolben, mikroaerophile Produktion in 250 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 100 mL, Medium: 50 g/L Glycerin und MgCO_3 , 10 g/L Hefeextrakt, kein Trypton, Kultivierungsdauer: 48 Tage, T: 32 °C, U: 150 rpm

Im weiteren Verlauf der Kultivierung, ab etwa Tag 30, waren keine wesentlichen Unterschiede bei der Verwertung des Substrats Glycerin sowie bei der Produktion von Bernsteinsäure (ca. 40 g/L) zwischen den freien und den immobilisierten Zellen auszumachen. Auch die Nebenprodukte erreichten nahezu ähnliche Level, mit Konzentrationen von etwa 8 g/L, in jedem Zyklus. Entgegen der Erwartung verlief die Bernsteinsäureproduktion mit LentiKats® wachstumsgekoppelt.

In Abbildung 64 wurde die Gesamt-Produktivität, die maximale Produktivität sowie der Ertragskoeffizient der LentiKats® (Abbildung 64 links) und der freien Zellen (Abbildung 64 rechts) während der einzelnen Zyklen in der Produktionsphase miteinander verglichen.

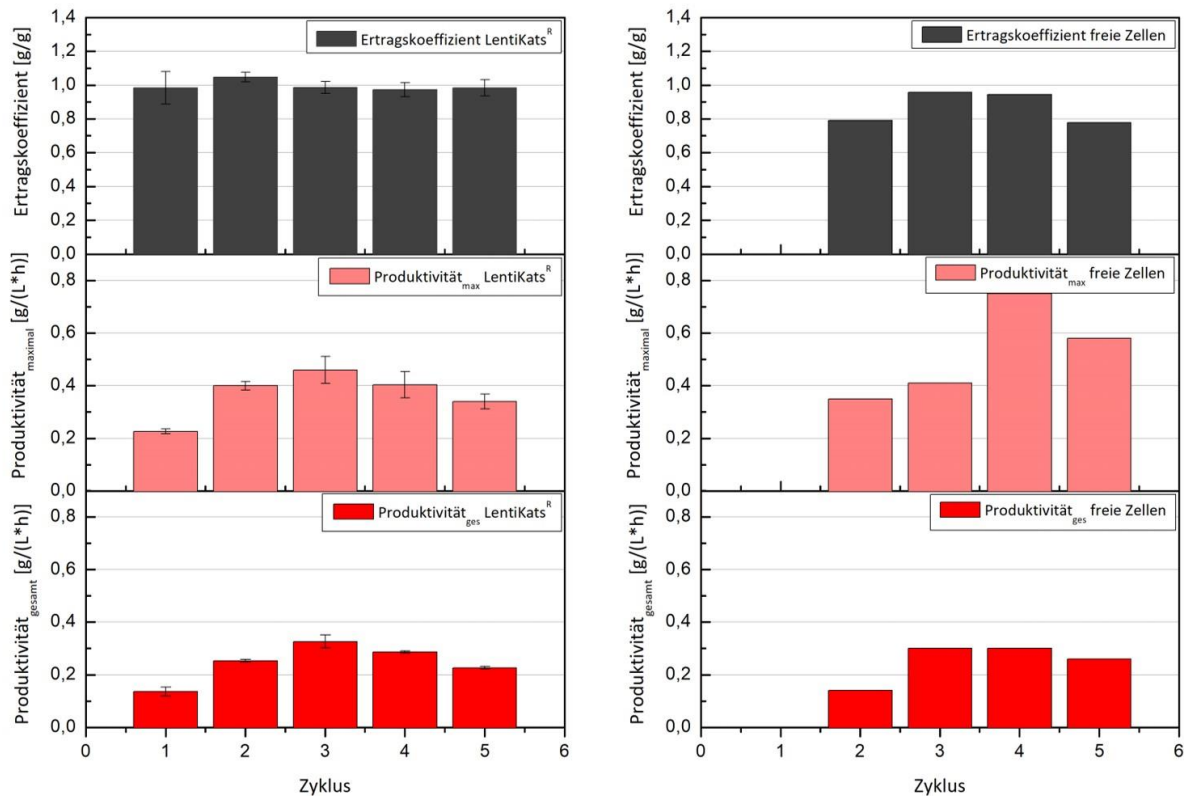


Abbildung 64: Vergleich von Ertragskoeffizient und Produktivität (maximal und gesamt) der Zyklen des Produktionsprozesses mit LentiKats® (links) und freien Zellen der Mischkultur DSM 32268 (rechts), Medium: Glycerin und MgCO_3 : 50 g/L, Hefeextrakt: 10 g/L; 250 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U 150 rpm, Kultivierungsdauer (gesamt): 48 Tage

Bei Betrachtung der Produktivität und des Ertragskoeffizienten während der einzelnen Zyklen in der Produktionsphase wird deutlich, dass ein nahezu konstanter Ertragskoeffizient von etwa $0,99 \pm 0,03$ g/g mit den immobilisierten Zellen erzielt wurde. Die Produktivität, bezogen auf den Gesamtprozess, stieg bis zum dritten Zyklus auf $0,33 \pm 0,02$ g/(L·h) an, in den folgenden zwei Zyklen sank diese jedoch wieder ab. Ein Optimum erreichte die maximale Produktivität ebenfalls im dritten Zyklus mit einem Wert von $0,46 \pm 0,05$ g/(L·h). Ein Vergleich mit den freien Zellen zeigt auf, dass die maximale Produktivität erst im vierten Zyklus mit einem Wert von 0,75 g/(L·h) die der immobilisierten Zellen deutlich überstieg. Auch die Gesamt-Produktivität stieg bis zum vierten Zyklus auf 0,3 g/(L·h) an. Anschließend sank diese jedoch gering auf 0,26 g/(L·h) ab. Der Ertragskoeffizient der freien Zellen erreichte im dritten und vierten Zyklus der Produktionsphase ein Maximum von 0,95 g/g. Im folgenden Zyklus verringerte sich der Wert auf 0,78 g/g. Fehlende Werte für die Produktivität und den Ertragskoeffizienten der freien Zellen im ersten Zyklus der Produktionsphase erklärten sich durch die Umstellung der Stoffwechselwege. Durch das Vorherrschen der aeroben Wachstumsphase wurde das bernsteinsäurebildende Actinobacteria-Isolat in der Mischkultur DSM 32268 unterdrückt. Erst durch das mikroaerophile Milieu fand eine Anpassung und anschließende Bernsteinsäureproduktion statt. Sodass darauf zu schließen war, dass die freien Zellen eine längere Zeit als die immobilisierten Zellen benötigten, um geeignete Produktionsbedingungen zu schaffen.

Zudem wurde herausgestellt, dass die Morphologie der LentiKats® einen entscheidenden Einfluss auf die Bernsteinsäureproduktion hatte. Durch die Entnahme einzelner Linsen aus dem Kultivierungsprozess und anschließendem Einfärben mit Karbolfuchsin wurden die Zellen in den LentiKats® farbig dargestellt, während die Polyvinylalkohol-Matrix durch das Auswaschen mit Wasser wieder entfärbt wurde (Abbildung 65).



Abbildung 65: Darstellung der linsenförmigen LentiKats® im Kultivierungsverlauf durch Einfärben der Zellen mit Karbolfuchsin

Während des aeroben Wachstums im Schikanekolben kam es zunächst zur Vermehrung der Zellen in den LentiKats®. Nach Übergang in die mikroaerophile Produktionsphase veränderte sich die Morphologie der Immobilisate. Diese wurden durchscheinender und weniger kompakt, was wahrscheinlich daraus resultierte, dass die Zellen aus den Immobilisaten ins Medium übergingen und folgend als freie Zellen fungierten. Darüber hinaus wurde eine deutliche Änderung der Struktur der LentiKats® beobachtet. Während nach 9-tägiger Kultivierungsdauer die eingeschlossenen und gefärbten Zellen über die gesamte Oberfläche verteilt waren, deutete sich nach 16 Tagen bereits an, dass sich im Zentrum der linsenförmigen LentiKats® eine durchscheinende Fläche abzeichnete. Diese weitete sich mit fortschreitender Kultivierungsdauer aus, sodass sich die Zellen nach einer Inkubationszeit von 34 Tagen ausschließlich am Rand der LentiKats® angelagert hatten. Im Zentrum der linsenartigen Strukturen schienen die Zellen folglich abgestorben zu sein. Dieser Zustand änderte sich auch nach 41-tägiger Kultivierungsdauer nicht. Die mit zunehmender Kultivierungszeit steigende OD_{605nm} (Abbildung 63) sowie mikroskopische Aufnahmen der Kultursuspension während der Produktionsphase (Abbildung 66) bestätigten nochmals das Austreten der Zellen aus den Immobilisaten.

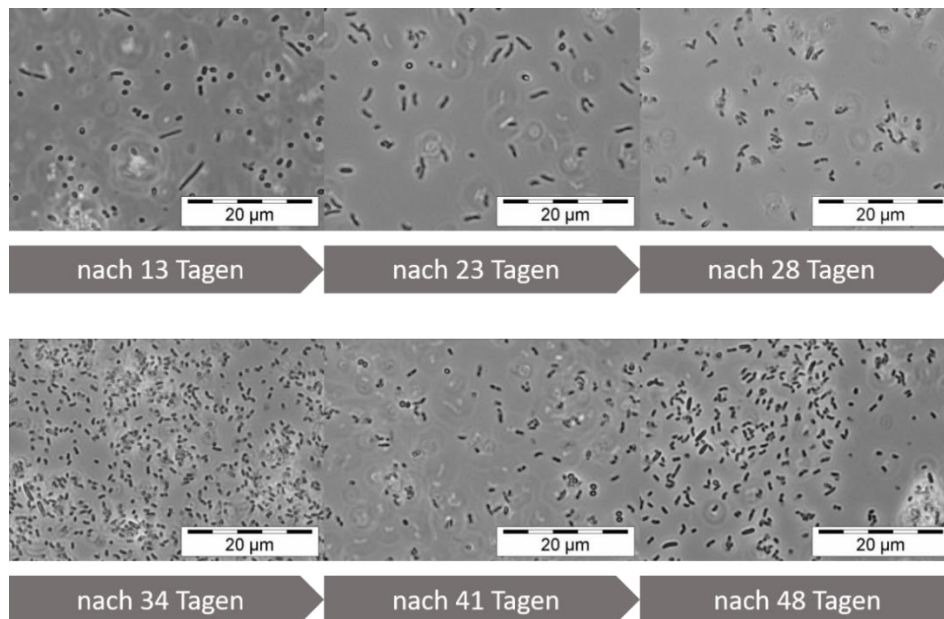


Abbildung 66: Mikroskopische Aufnahmen der Kultursuspension der Immobilisate während der Produktionsphase, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/ 1,3 Oil/Ph3

Während die Morphologie der Zellen nach 13 Tagen längere Stäbchen von bis zu einer Länge von 8 µm sowie kokkenförmige Bakterienformen aufwies, veränderte sich diese mit zunehmender Kultivierungsdauer der mikroaerophilen Produktion. Nach 34 Tagen waren die Zellen auf eine Größe von 1 – 1,5 µm geschrumpft, was als Indiz für eine effiziente Bernsteinsäureproduktion gilt. Es ist davon auszugehen, dass durch die aeroben Wachstumsbedingungen im Schikanekolben zwar eine Vermehrung der Zellen in den LentiKats® stattfand, aber in der Kultursuspension möglicherweise die Spezies *Paenibacillus lautus* das bernsteinsäureproduzierende Actinobacteria-Isolat der Mischkultur DSM 32268 überwuchs. Erst als die Bedingungen ins mikroaerophile Milieu wechselten, wurde letztgenannter Mikroorganismus wieder begünstigt und drängte den *Paenibacillus lautus* in den Hintergrund.

Damit schien eine Immobilisierung der Zellen in LentiKats® nicht zielführend für den Prozess der biotechnologischen Bernsteinsäureproduktion mit der Mischkultur DSM 32268 zu sein, denn möglicherweise produzierten nicht die in den LentiKats® immobilisierten Zellen die Bernsteinsäure, sondern die daraus austretenden Zellen. Durch das vorherrschende symbiontische Verhältnis in der Mischkultur DSM 32268 ist davon auszugehen, dass die *Paenibacillus*-Spezies unter den untersuchten Bedingungen während einer Kultivierung auf Standardproduktionsmedium bereits nützliche Konditionen schafft, unter denen eine Bernsteinsäureproduktion seitens des Actinobacteria-Isolates möglich ist.

Eine Produktivitätssteigerung wurde mit Hilfe der Immobilisierung der Mischkultur DSM 32268 nicht erreicht. Erst durch eine Trennung beider Mikroorganismen voneinander und der detaillierten Beschreibung der Ansprüche des unbekannten Actinobacteria-Isolates ist eine erneute

Immobilisierung der Zellen denkbar. Erdenklich wäre zudem, dass der Prozess folglich als wachstumsentkoppelt charakterisiert werden könnte. Ein Verbleiben der Zellen in den Lenti-Kats® würde kein weiteres Wachstum erfordern, da bereits eine optimale Zelldichte vorläge und die Immobilisate somit in der Lage wären, kontinuierlich Bernsteinsäure zu produzieren.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die neuartige Mischkultur DSM 32268, bei der es sich um Wildtyp-Stämme einer Actinobacteria- und einer *Paenibacillus*-Spezies handelte, ein effizientes Verfahren zur Bernsteinsäureproduktion entwickelt. Durch die Etablierung einer Zwischenkultur wurde die Reproduzierbarkeit der gesamten Arbeiten sichergestellt. Mit Hilfe von Laborflaschen, die mit einem Deckel sowie eingelassenem Silikonkautschukseptum und Kanüle versehen wurden, konnte ein mikroaerophiles Milieu geschaffen werden, sodass eine nutzbringende Bernsteinsäurebildung gewährleistet war. Zusätzlich wurde eine tägliche Probenahme im 5-Tagesrhythmus festgesetzt. Ferner wurde über die Schüttelfrequenz und das Arbeitsvolumen ein optimaler Lufteintrag in den Laborflaschen ermittelt. Die bestmögliche Schüttelfrequenz ist in einem Bereich zwischen 150 und 200 rpm anzugeben. Das Arbeitsvolumen, das die Luftmenge im Kopfraum der Laborflaschen definiert, nahm die Hälfte des Nennvolumens der Laborflasche ein. In diesem Fall betrug das Arbeitsvolumen 50 mL. Die optimale Produktionstemperatur wurde für einen Bereich zwischen 30 und 32 °C formuliert, wenngleich sämtliche Arbeiten bei der wirtschaftlich effizienteren Temperatur von 32 °C durchgeführt wurden. Die Inokulationsmenge wurde mit 2 % des eingesetzten Medienvolumens festgesetzt.

Neben der Regulierung des pH-Wertes während einer Kultivierung fungierte Magnesiumcarbonat in diesem Prozess zusätzlich als CO₂-Quelle. Die Bernsteinsäurebildung der Mischkultur DSM 32268 konnte somit über die reduktive Route des TCA-Zyklus gelenkt werden. Für eine effiziente Verwertung des eingesetzten Pharmaglycerins wurden identische Mengen an Magnesiumcarbonat verwendet. Eine Initial-Glycerinkonzentration von bis zu 125 g/L führte zu keiner Substratinhibierung, eine Inhibierung der Bernsteinsäurebildung bis zu einem Titer von 84 g/L konnte ebenso wenig festgestellt werden.

Alternativ zu Pharmaglycerin wurden verschiedene Pentosen und Hexosen untersucht. Eine vollständige Verwertung der Substrate wurde aufgezeigt, allerdings resultierte eine geringe Umsetzung von maximal 40 % zu Bernsteinsäure. Einzig mit dem Anion der Gluconsäure, Na-D-Gluconat, konnte ein vergleichbarer Ertragskoeffizient von 0,85 g/g erzielt werden.

Ferner wurde die Fähigkeit der Mischkultur DSM 32268 zur Verwertung von Rohglycerin der geringsten Aufreinigungsstufe, zunächst mit einer Konzentration von 50 g/L, untersucht. Dabei wurden identische Bernsteinsäureendkonzentrationen, Ertragskoeffizienten und Produktivitäten wie mit Pharmaglycerin herausgestellt. Ab einer Anfangskonzentration von 100 g/L brachte die Mischkultur DSM 32268 mit dem Rohglycerin der Charge K602 eine deutlich geringere Bernsteinsäuremenge hervor, während mit dem Rohglycerin der Charge K501 nur eine geringfügig kleinere Produktmenge im Vergleich zu Pharmaglycerin resultierte. Eine anschließende Identifizierung möglicher Inhibitoren sollte im Fortgang erfolgen.

Die versuchte Isolierung der Actinobacteria-Spezies aus dieser Mischkultur erforderte zeitintensive Arbeiten. Es wurde herausgestellt, dass es sich hierbei wohlmöglich um eine synergistische Wechselwirkung der Mikroorganismen handelte. Durch die gegenseitige Abhängigkeit konnte keine Trennung auf selektivem Medium erfolgen. Unter aeroben Bedingungen überwuchs der Stamm *Paenibacillus lautus* das unbekannte Actinobacteria-Isolat, unter anaeroben Bedingungen wurde kein Wachstum festgestellt. Zahlreiche Arbeiten zur Handhabung mit der Mischkultur DSM 32268 trugen jedoch erheblich zum Verständnis der biotechnologischen Bernsteinsäurebildung des Actinobacteria-Isolates in der Mischkultur DSM 32268 bei.

Die Entwicklung eines definierten Produktionsmediums erwies sich aufgrund des Vorliegens der beiden Mikroorganismen in der Mischkultur DSM 32268 als sehr schwierig. Eine Variation der einzelnen Medienkomponenten im Standardproduktionsmedium zeigte ausschließlich bei Calciumchlorid und Natriumchlorid bei steigender Konzentration eine Abnahme der Bernsteinsäurebildung.

Die Komplexmedienbestandteile Trypton und Hefeextrakt zeigten identische Produktspektren bei der Mischkultur DSM 32268. Ein völliger Verzicht dieser führte zu einer drastischen Abnahme der Bernsteinsäurekonzentration. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die im Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren und Vitamine maßgeblich die Bernsteinsäurebildung der Mischkultur DSM 32268 fördern. Dennoch konnte durch Supplementierung einzelner Aminosäuren und Vitamine keine Steigerung des Bernsteinsäure-Titers erzielt werden. Um den Prozess wirtschaftlich rentabel gestalten zu können, sollten Alternativen für die Komplexmedienbestandteile Hefeextrakt und Trypton aufgezeigt werden.

Die Immobilisierung der Zellen in LentiKats® sollte der Produktivitätssteigerung dienen. Aufgrund des nachträglichen Ausmachens einer vorliegenden Mischkultur bei DSM 32268 zeigten die Immobilisate noch nicht die erwünschte Steigerung auf. Eine eindeutige Trennung des Actinobacteria-Isolates vom Stamm *Paenibacillus lautus* hätte vermutlich ein effektiveres Bewachsen der LentiKats® zur Folge gehabt. Die Produktion könnte in dem Fall wachstumsentkoppelt stattfinden.

Ein Ansatzpunkt dafür ist die durchflusszytometrische Zellsortierung. Dabei soll geprüft werden, ob die Bernsteinsäurebildung nur in der Gemeinschaft erfolgt. Die Grundlage dieser Analyse ist der hydrodynamische Transport der Zellen und deren optische Vermessung mittels Laserstrahl nach spezifischen Färbungen. In der Zellsuspension werden die unterschiedlichen Zelltypen identifiziert und anschließend isoliert.

Ferner können zudem Mikrobiomanalysen zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften aus Böden durchgeführt werden. Hierbei werden die mikrobiellen Aktivitäten und

Wechselwirkungen untersucht und es kann herausgestellt werden, ob die Bernsteinsäurebildung der Mischkultur DSM 32268 kooperativ erfolgt. Dazu werden die Nukleinsäuren direkt extrahiert und die verwandtschaftlichen Beziehungen der 16S-rRNA-Gene bioinformatisch analysiert ⁷⁷.

Nach erfolgter Trennung der Mikroorganismen aus der Mischkultur DSM 32268 können die Nährstoffansprüche aufgeklärt werden, einhergehend mit der Entwicklung eines definierten Produktionsmediums. Eine Produktivitätssteigerung auf über 2,5 g/(L·h) ist dabei zielführend und konkurrenzfähig.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rohstoffe für die Biodieselproduktion in den Jahren 2016 und 2018 in Deutschland ⁸	3
Abbildung 2: Rohölpreise in jährlicher Entwicklung für die Jahre 2011 (grün), 2014 (gelb), 2017 (blau), 2018 (braun) und 2019 (rot), Stand: Juni 2019 ³⁴	10
Abbildung 3: Stoffwechselwege der Bernsteinsäurebildung (1: Lactat-Dehydrogenase, 2: Formiat-Acetyltransferase, 3: Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase, 4: Acetaldehyd-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase)	17
Abbildung 4: <i>Paenibacillus lautus</i> DSM 13411 auf Nutrient Agar nach 6 Tagen Inkubationsdauer	19
Abbildung 5: Wachstumsverhalten von Mikroorganismen in Thioglykolatbouillon hinsichtlich des Sauerstoffbedarfs	20
Abbildung 6: Schema des MPN-Verfahrens zur Gewinnung von Reinkulturen	21
Abbildung 7: Zur Kultivierung verwendete Laborflaschen, verschlossen mit Schraubkappen mit Silikonkautschukseptum und Kanüle	28
Abbildung 8: Schema der Probenverarbeitung während einer Kultivierung	30
Abbildung 9: Zur Herstellung von LentiKats [®] verwendeter LentiKat-Printer der Firma geniaLab [®] (links), auf Petrischalen geprintete LentiKats [®] (rechts)	31
Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 in Standardproduktionsmedium, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	39
Abbildung 11: Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf LB-Agarplatten (links), stereomikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf LB-Agarplatten (rechts) ..	40
Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf einer Nährplatte (LB-Medium mit 100 g/L Glycerin), Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	40
Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 während der Produktion auf Glycerin, Veränderung der Morphologie von Stäbchen zu kokkenförmigen Zellen, Zeiss Axioplan, Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	41
Abbildung 14: <i>P. lautus</i> DSM 13411 auf einer LB-Agarplatte mit 50 g/L Glycerin, links: Fotografie der Agarplatte, mitte: stereomikroskopische Aufnahme der Kolonien auf der Agarplatte, rechts: mikroskopische Aufnahme des Stammes DSM 13411, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	42
Abbildung 15: Mischkultur DSM 32268 auf einer LB-Agarplatte mit 20 g/L Glycerin, links: Fotografie der LB-Agarplatte, rechts: mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	43
Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahme des Stammes <i>P. lautus</i> DSM 13411 auf einer Nutrient Agarplatte, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	43
Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahme der Mischkultur DSM 32268 auf Nutrient Agarplatte, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3	44

- Abbildung 18:** *P. lautus* DSM 13411 (links) und Mischkultur DSM 32268 (rechts) auf Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3.....44
- Abbildung 19:** Produktspektren von *P. lautus* DSM 13411 (oben) und der Mischkultur DSM 32268 (unten) auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L); Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL.....45
- Abbildung 20:** Kultivierungsverlauf (links) der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L) aus Milchsäure-Vorkultur; Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, mikroskopische Aufnahme (rechts) der Mischkultur DSM 32268 nach Beendigung der Kultivierung, ausgestrichen auf Nutrient Agarplatten, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3.....47
- Abbildung 21:** Schematische Darstellung (links) und stereomikroskopische Aufnahme (rechts) der Actinomycete Isolation Agarplatten der Mischkultur DSM 32268 (oben) mit zwei unterschiedlichen Kolonieformen und der Reinkultur des *P. lautus* DSM 13411 (unten) mit nur einer Kolonieform48
- Abbildung 22:** Mikroskopische Aufnahmen der Mischkultur DSM 32268 isoliert von einer AIA-Platte und anschließend auf NA-Platte und in NB-Medium kultiviert, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3.....49
- Abbildung 23:** Mikroskopische Aufnahmen des *P. lautus* DSM 13411 isoliert von einer AIA-Platte und anschließend in NB-Medium kultiviert, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph3.....49
- Abbildung 24:** Produktspektren der Kultivierungen auf Standardproduktionsmedium (je 50 g/L Glycerin und MgCO_3) von a: *P. lautus* DSM 13411, b: Mischkultur DSM 32268, c: abgegrenzte Kolonie der Mischkultur DSM 32268, d: verlaufene Kolonie der Mischkultur DSM 32268; Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL.....50
- Abbildung 25:** Thioglykolat-Test zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs der Mischkultur DSM 32268 und von *P. lautus* DSM 1341152
- Abbildung 26:** Inokulationsstrategie zur Etablierung einer Zwischenkultur ausgehend von einer Kryokultur bis zu einer Hauptkultur53
- Abbildung 27:** Kultivierungsverlauf einer Zwischenkultur der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L); Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL ..54
- Abbildung 28:** Morphologie der wachstumsgekoppelten Produktion der Mischkultur DSM 32268 während einer Zwischenkultur auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (50 g/L), Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph355
- Abbildung 29:** Schematischer Kultivierungsverlauf einer Hauptkultur der Mischkultur DSM 32268 auf Standardproduktionsmedium mit Glycerin und MgCO_3 (100 g/L); Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL.....55

- Abbildung 30:** Korrelation von Optischer Dichte (OD_{605nm}) und Biotrockenmasse (BTM) während einer Kultivierung auf Standardproduktionsmedium auf Glycerin und $MgCO_3$ (100 g/L) für die Mischkultur DSM 32268, Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL56
- Abbildung 31:** Kultivierungssysteme, die für eine mikroaerophile Produktion von Bernsteinsäure der Mischkultur DSM 32268 in Betracht gezogen wurden, Laborflaschen und Serumflaschen jeweils mit Deckel und Kanüle sowie geschlossen, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$, Kultivierungsbedingungen: T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Labor- bzw. Serumflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, nach 14 Tagen Kultivierungsdauer58
- Abbildung 32:** Produktspektrum der Laborflaschen-Kultivierungen der Mischkultur DSM 32268 mit Einfluss der Probenahme nach 11 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Mo: Montag, Fr: Freitag, So: Sonntag60
- Abbildung 33:** Einfluss der Schüttfrequenz des Inkubators auf die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und $MgCO_3$ nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle61
- Abbildung 34:** Einfluss des Arbeitsvolumens in den Laborflaschen auf die Optische Dichte (OD_{605nm}) der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$ mit 14 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen variabel von 30 bis 70 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle63
- Abbildung 35:** Einfluss des Arbeitsvolumens auf die Substratverwertung und Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$, Arbeitsvolumen variabel von 30 bis 70 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle64
- Abbildung 36:** Einfluss des Arbeitsvolumens auf die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, End-Titer nach vollständigem Aufbrauchen des Substrats bzw. nach maximal 14 Tagen, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$, Arbeitsvolumen variabel zwischen 30 und 70 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle65
- Abbildung 37:** Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und $MgCO_3$ nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle66
- Abbildung 38:** Einfluss der Temperatur auf die Optische Dichte der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L Glycerin und $MgCO_3$ nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle67
- Abbildung 39:** Einfluss der Inokulationsmenge auf den Verlauf der Optischen Dichte (OD_{605nm}) der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und $MgCO_3$ nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle68

- Abbildung 40:** Einfluss der Inokulationsmenge auf die Produktivität (gesamt und maximal) der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und MgCO_3 nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle69
- Abbildung 41:** Einfluss der Magnesiumcarbonatmenge auf das Wachstum ($\text{OD}_{605\text{nm}}$), den pH-Wert und die Substratverwertung sowie Produktbildung der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Pharmaglycerin, MgCO_3 -Konzentration variabel zwischen 25 und 100 g/L bei einer Kultivierungsdauer von 13 Tagen, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle71
- Abbildung 42:** Prüfung verschiedener Carbonatquellen auf ihre Eignung zur Produktion von Bernsteinsäure, Glycerinkonzentration: 50 g/L, Carbonatkonzentration: MgCO_3 50 g/L, CaCO_3 (pulverisiert und gefällt) 50 g/L, NaHCO_3 25 g/L, bei einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle72
- Abbildung 43:** Verlauf des pH-Wertes bei der Kultivierung mit verschiedenen Carbonatquellen, Glycerinkonzentration: 50 g/L, Carbonatkonzentration: MgCO_3 : 50 g/L, CaCO_3 (pulverisiert und gefällt): 50 g/L, NaHCO_3 : 25 g/L, bei einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle73
- Abbildung 44:** Einfluss der Initial-Glycerinkonzentration auf die Produktkonzentration und den pH-Wert der Mischkultur DSM 32268, Standardproduktionsmedium mit variabler Glycerinkonzentration zwischen 50 und 100 g/L und identischer MgCO_3 -Konzentration, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle74
- Abbildung 45:** Einfluss der Initial-Glycerinkonzentration auf Ertragskoeffizient und Produktivität der Mischkultur DSM 32268 nach vollständigem Aufbrauchen von Glycerin bzw. 11 Tagen Kultivierungsdauer, Standardproduktionsmedium mit variabler Pharmaglycerinkonzentration zwischen 50 und 100 g/L und identischer MgCO_3 -Konzentration, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle75
- Abbildung 46:** Kultivierungsverlauf in Bezug auf Substratverbrauch und Produktbildung (Bernsteinsäure) für a: L-Arabinose und D-Fructose, b: Na-D-Gluconat und D-Glucose, c: Glycerin und D-Lactose, d: D-Mannose und Saccharose, e: D-Sorbit und D-Xylose, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U: 150 rpm, eingesetzte Substrat- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L.....79
- Abbildung 47:** Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Substratquellen im Vergleich zu Glycerin, Darstellung der Produkte und Nebenprodukte (Milch-, Ameisen- und Essigsäure), eingesetzte Substrat-Konzentration: 50 g/L, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L MgCO_3 , Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle80
- Abbildung 48:** Mikroskopische Aufnahmen der Mischkultur DSM 32268 bei Verwertung der unterschiedlichen Substratquellen auf Standardproduktionsmedium mit MgCO_3 , Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph383
- Abbildung 49:** Verlauf der Optischen Dichte während der Kultivierung auf Rohglycerinen K501 und K602 sowie Glycerin in Pharmaqualität in 100 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L, Kultivierungsdauer: 7 Tage, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm85

- Abbildung 50:** Kultivierung in 100 mL Laborflaschen mit Kanüle und Septum auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 im Vergleich zu Pharmaglycerin, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L, Kultivierungs-dauer: 7 Tage, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm.....86
- Abbildung 51:** Mikroskopische Aufnahme zur Morphologie der Zellen bei den Kultivierungen mit Rohglycerin (K501 und K602) und Pharmaglycerin nach 5 Tagen Kultivierungsdauer, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/1,3 Oil/Ph386
- Abbildung 52:** Ertragskoeffizient und Produktivität der Kultivierungen auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 sowie Glycerin in Pharmaqualität, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 50 g/L, Kultivierungsdauer: 7 Tage, 100 mL Laborflasche mit Kanüle und Septum, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm87
- Abbildung 53:** Kultivierung in 100 mL Laborflaschen mit Kanüle und Septum auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 im Vergleich zu Pharmaglycerin, eingesetzte Glycerinkonzentration: 100 g/L, Kultivierungsdauer: 14 Tage, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm88
- Abbildung 54:** Ertragskoeffizient und Produktivität der Kultivierungen auf den Rohglycerinen der Charge K501 und K602 sowie Pharmaglycerin, eingesetzte Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 100 g/L, Kultivierungsdauer: 14 Tage, 100 mL Laborflasche mit Kanüle und Septum, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm89
- Abbildung 55:** Einfluss der Variation der Konzentration ausgewählter Medienkomponenten auf die Produktbildung, unterstrichene fett formatierte Konzentration ist die im Standardproduktionsmedium vorliegende Konzentration, Glycerin- und MgCO_3 -Konzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage.....91
- Abbildung 56:** Produktkonzentrationen bei variierenden Hefeextraktkonzentrationen der Mischkultur DSM 32268, dabei Verzicht auf Trypton, Standard-Kultivierung (Referenz) mit Hefeextrakt 5 g/L und Trypton 5 g/L als gestrichelte Linie; Kultivierungsbedingungen: T 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, Kultivierungsdauer: 14 Tage.....93
- Abbildung 57:** Absoluter Anteil der freien Aminosäuren zum Zeitpunkt t = 0 d der Kultivierung, die in 10 g/L Hefeextrakt enthalten sind, Überstand der Kultursuspension wurde derivatisiert und anschließend mittels GC-FID vermessen, Kultivierung in 100 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, Standardproduktionsmedium mit 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat, T: 32 °C, U: 150 rpm.....95
- Abbildung 58:** Prozentualer Verbrauch der in 10 g/L Hefeextrakt enthaltenen Aminosäuren während einer Kultivierung mit Standardproduktionsmedium auf 100 g/L Glycerin und Magnesiumcarbonat nach 14 Tagen Kultivierungsdauer, T: 32 °C, U: 150 rpm, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle96
- Abbildung 59:** Supplementierung von Aminosäuren während einer Kultivierung auf je 100 g/L Glycerin und MgCO_3 sowie 1,5 g/L Hefeextrakt, normierter Bernsteinsäuretitert, gestrichelte Linie zeigt Bernsteinsäuretitert ohne Supplementierung einer Aminosäure und 1,5 g/L Hefeextrakt, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U: 150 rpm, Kultivierungsdauer: 14 Tage97

Abbildung 60: Vergleich der Produktkonzentrationen bei Kultivierung auf Minimalmedium (MM) (ohne und mit Hefeextrakt (MM+YE) mit einer Konzentration von 1,5 g/L) und Zugabe des Aminosäure-Mix (AS-Mix) (aus Tabelle 19) im Vergleich zu Komplexmedium (KM, Standardproduktionsmedium mit 10 g/L Hefeextrakt); Kultivierungsdauer: 14 Tage, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm.....99

Abbildung 61: Supplementierung von B-Vitaminen während einer Kultivierung auf je 100 g/L Glycerin und MgCO_3 sowie 1,5 g/L Hefeextrakt, normierter Bernsteinsäuretitel, gestrichelte Linie stellt Bernsteinsäuretitel ohne Supplementierung von B-Vitaminen dar, Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U: 150 rpm, Kultivierungsdauer: 14 Tage101

Abbildung 62: Vergleich der Substrat- und Produktkonzentration während der Kultivierungen von freien Zellen der Mischkultur DSM 32268 mit immobilisierten Zellen in LentiKats®, 2-phasige Kultivierung: aerobe Anzucht in 250 mL Schikanekolben, mikroaerophile Produktion in 250 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 100 mL, Medium: 50 g/L Glycerin und MgCO_3 , 10 g/L Hefeextrakt, kein Trypton/Pepton, Kultivierungsdauer: 48 Tage, T: 32 °C, U: 150 rpm102

Abbildung 63: Vergleich des Zellwachstums und des pH-Wertes während der Kultivierungen von freien Zellen der Mischkultur DSM 32268 mit immobilisierten Zellen in LentiKats®, 2-phasige Kultivierung: aerobe Anzucht in 250 mL Schikanekolben, mikroaerophile Produktion in 250 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, Arbeitsvolumen: 100 mL, Medium: 50 g/L Glycerin und MgCO_3 , 10 g/L Hefeextrakt, kein Trypton, Kultivierungsdauer: 48 Tage, T: 32 °C, U: 150 rpm104

Abbildung 64: Vergleich von Ertragskoeffizient und Produktivität (maximal und gesamt) der Zyklen des Produktionsprozesses mit LentiKats® (links) und freien Zellen der Mischkultur DSM 32268 (rechts), Medium: Glycerin und MgCO_3 : 50 g/L, Hefeextrakt: 10 g/L; 250 mL Laborflaschen mit Septum und Kanüle, T: 32 °C, U 150 rpm, Kultivierungsdauer (gesamt): 48 Tage.....105

Abbildung 65: Darstellung der linsenförmigen LentiKats® im Kultivierungsverlauf durch Einfärben der Zellen mit Karbolfuchsin106

Abbildung 66: Mikroskopische Aufnahmen der Kultursuspension der Immobilisate während der Produktionsphase, Zeiss Axioplan Phasenkontrast, Objektiv 100x/ 1,3 Oil/Ph3107

Abbildung 67: Aufsummierung der gebildeten Produkte (Bernstein-, Milch-, Ameisen- und Essigsäure) im Vergleich zum eingesetzten Substrat mit einer Initialkonzentration von 50 g/L, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L MgCO_3 , Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle127

Abbildung 68: Optische Dichte der Mischkultur DSM 32268 bei variierender NaCl-Konzentration von 0 g/L, 0,5 g/L, 1,0 g/L (Standard), 1,5 g/L und 3,0 g/L in Standardproduktionsmedium, Glycerin- und Magnesiumkonzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage.....127

Abbildung 69: Verlauf der Optischen Dichte bei der Mischkultur DSM 32268 bei Variation der Hefeextraktkonzentration, Standardproduktionsmedium, Glycerin- und Magnesiumkonzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage128

Abbildung 70: Substratverbrauch bei Variation der Hefeextraktkonzentration, Standardproduktionsmedium, Glycerin- und Magnesiumkonzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T = 32 °C, U = 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage.....	128
---	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften von Glycerin (SDB, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland)	5
Tabelle 2: Physikalische und chemische Eigenschaften der Bernsteinsäure (SDB, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	8
Tabelle 3: Unternehmen und Konsortien, die biobasierte Bernsteinsäure herstellen ^{20,26,38} , mit * gekennzeichnete Mikroorganismen sind gentechnisch verändert (GVO).....	12
Tabelle 4: Aktueller Wissensstand zu verschiedenen Bernsteinsäureproduzenten in Forschung und Entwicklung mit Angaben zum Substrat, zur Bernsteinsäure-Konzentration, Ertragskoeffizient und Produktivität	14
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Rohglycerine (Herstellerangaben), Werte übernommen aus ⁶⁹	22
Tabelle 6: Zusammensetzung des Difco™ Nutrient Agars	24
Tabelle 7: Zusammensetzung der Nutrient Broth	24
Tabelle 8: Zusammensetzung des LB-Mediums nach Lennox	24
Tabelle 9: Zusammensetzung des Actinomycete Isolation Agars.....	25
Tabelle 10: Zusammensetzung des Standardproduktionsmediums zur Bernsteinsäureproduktion.....	26
Tabelle 11: Zusammensetzung des Thioglykolat-Nährmediums	27
Tabelle 12: Betriebsparameter der HPLC-Anlage zur Detektion der Substrate und Produkte	36
Tabelle 13: Betriebsparameter des GC-FID	37
Tabelle 14: Betriebsparameter des GC-FID zur Bestimmung der freien Aminosäuren in Kultursuspensionen	37
Tabelle 15: Gegenüberstellung von Ertragskoeffizient ($Y_{P/S}$), Produktivität (P) und Produkte (Bernsteinsäure BS, Milchsäure MS, Ameisensäure AS, Essigsäure ES) von Sorbit, Glucose, Gluconat und Glycerin	82
Tabelle 16: Variationsbereich der Konzentrationen der einzelnen Medienkomponenten im Standardproduktionsmedium, fett gedruckt ist die Standardkonzentration	90
Tabelle 17: Typanalyse von Trypton/Pepton aus Casein (Roth) und Hefeextrakt (Merck Millipore) laut Hersteller	94
Tabelle 18: Aminosäure-Mix mit optimalen Konzentrationen, die die Bernsteinsäureproduktion positiv beeinflusst haben	98

Literatur

- (1) Paschotta, R. RP-Energie-Lexikon - fossile Energieträger, Umweltbelastungen, Emissionen, Klimagefahren, Abhängigkeit, Ausstieg https://www.energie-lexikon.info/fossile_energetraeger.html (zuletzt abgerufen am 29. Oktober 2019).
- (2) Erneuerbare Energien - Vermiedene Treibhausgase | Umweltbundesamt <https://www.umweltbundesamt.de/daten/energie/erneuerbare-energien-vermiedene-treibhausgase> (zuletzt abgerufen am 23. Oktober 2019).
- (3) Umweltbewusstsein in Deutschland 2018 <https://www.bmu.de/publikation/umweltbewusstsein-in-deutschland-2018/> (zuletzt abgerufen am 29. Oktober 2019).
- (4) Jiang, M.; Ma, J.; Wu, M.; Liu, R.; Liang, L.; Xin, F.; Zhang, W.; Jia, H.; Dong, W. Progress of succinic acid production from renewable resources: metabolic and fermentative strategies. *Bioresource Technology* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.209>.
- (5) Becker, J.; Wittmann, C. Biotechnologie von Morgen: metabolisch optimierte Zellen für die bio-basierte Produktion von Chemikalien und Treibstoffen, Materialien und Gesundheitsprodukten. *Angewandte Chemie* 2015, 127 (11), 3383–3407. <https://doi.org/10.1002/ange.201409033>.
- (6) Tan, J. P.; Jahim, J. M.; Harun, S.; Wu, T. Y. Overview of the potential of bio-succinic acid production from oil palm fronds. *Journal of Physical Science* 2017, 28 (Supp. 1), 53–72.
- (7) Majer, S.; Gröngroft, A.; Drache, C. Technische und methodische Grundlagen Der THG-Bilanzierung von Biodiesel. DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH 2015.
- (8) Biodiesel - VDB - Verband der Deutschen Biokraftstoffindustrie e.V. <http://www.biokraftstoffverband.de/index.php/biodiesel.html> (zuletzt abgerufen am 12. August, 2019).
- (9) Nanda, M. R.; Yuan, Z.; Qin, W.; Poirier, M. A.; Chunbao, X. Purification of crude glycerol using acidification: effects of acid types and product characterization. *Austin Journal of Chemical Engineering* 2014, 1 (1), 1–7.
- (10) Tan, J. P.; Md. Jahim, J.; Wu, T. Y.; Harun, S.; Kim, B. H.; Mohammad, A. W. Insight into biomass as a renewable carbon source for the production of succinic acid and the factors affecting the metabolic flux toward higher succinate yield. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2014, 53 (42), 16123–16134. <https://doi.org/10.1021/ie502178j>.
- (11) Glyzerindestillation und -bleichung | Air Liquide <https://www.engineering-air-liquide.com/de/glyzerindestillation-und-bleichung> (zuletzt abgerufen am 15. August 2019).
- (12) Groenewald, M.; Boekhout, T.; Neuvéglise, C.; Gaillardin, C.; Dijck, P. W. M. van; Wyss, M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* 2014, 40 (3), 187–206. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>.

- (13) Bockey, D. Biodiesel 2017/2018 Sachstandsbericht Und Perspektive - Auszug aus dem UFOP-Jahresbericht. UNION ZUR FÖRDERUNG VON OEL- UND PREOTEINPFLANZEN E.V. (UFOP) Oktober 2018.
- (14) Blankschien, M. D.; Clomburg, J. M.; Gonzalez, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metabolic Engineering* 2010, 12 (5), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.06.002>.
- (15) Bretz, K. Succinic acid production in fed-batch fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as carbon source. *Chemical Engineering & Technology* 2015, 38 (9), 1659–1664. <https://doi.org/10.1002/ceat.201500015>.
- (16) Lee, P. C.; Lee, W. G.; Lee, S. Y.; Chang, H. N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 72 (1), 41–48. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010105\)72:1<41::AID-BIT6>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010105)72:1<41::AID-BIT6>3.0.CO;2-N).
- (17) Li, Q.; Wu, H.; Li, Z.; Ye, Q. Enhanced succinate production from glycerol by engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource Technology* 2016, 218, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.090>.
- (18) Werpy, T.; Petersen, G. *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*; United States, 2004. <https://doi.org/10.2172/15008859>.
- (19) Bozell, J. J.; Petersen, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry* 2010, 12 (4), 539–554. <https://doi.org/10.1039/B922014C>.
- (20) Jansen, M. L. A.; van Gulik, W. M. Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Current Opinion in Biotechnology* 2014, 30, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.003>.
- (21) Bechthold, I.; Bretz, K.; Kabasci, S.; Kopitzky, R.; Springer, A. Succinic Acid: a new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chemical Engineering & Technology* 2008, 31 (5), 647–654. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800063>.
- (22) Bradfield, M. F. A.; Mohagheghi, A.; Salvachúa, D.; Smith, H.; Black, B. A.; Dowe, N.; Beckham, G. T.; Nicol, W. Continuous succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* on xylose-enriched hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels* 2015, 8 (1), 181. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0363-3>.
- (23) McKinlay, J. B.; Vieille, C.; Zeikus, J. G. Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, 76 (4), 727–740. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1057-y>.
- (24) Cukalovic, A.; Stevens, C. V. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2008, 2 (6), 505–529. <https://doi.org/10.1002/bbb.105>.
- (25) Ferone, M.; Raganati, F.; Ercole, A.; Olivieri, G.; Salatino, P.; Marzocchella, A. Continuous succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a packed-bed biofilm reactor. *Biotechnology for Biofuels* 2018, 11 (1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1143-7>.

- (26) Ahn, J. H.; Jang, Y.-S.; Lee, S. Y. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 2016, 42, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.034>.
- (27) Cimini, D.; Argenzio, O.; D'Ambrosio, S.; Lama, L.; Finore, I.; Finamore, R.; Pepe, O.; Faraco, V.; Schiraldi, C. Production of succinic acid from *Basfia succiniciproducens* up to the pilot scale from arundo donax hydrolysate. *Bioresource Technology* 2016, 222, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.004>.
- (28) WEASTRA. WP8.1. Determination of market potential for selected platform chemicals. itaconic acid, succinic acid, 2,5-furandicarboxylic acid https://www.igb.fraunhofer.de/content/dam/igb/en/documents/publications/BioConSepT_Market-potential-for-selected-platform-chemicals_ppt1.pdf. (zuletzt abgerufen am 15. August 2019)
- (29) Mazière, A.; Prinsen, P.; García, A.; Luque, R.; Len, C. A Review of progress in (bio)catalytic routes from/to renewable succinic acid. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2017, 11 (5), 908–931. <https://doi.org/10.1002/bbb.1785>.
- (30) Song, H.; Lee, S. Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, 39 (3), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2005.11.043>.
- (31) Zeikus, J. G.; Jain, M. K.; Elankovan, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, 51 (5), 545–552. <https://doi.org/10.1007/s002530051431>.
- (32) Choi, S.; Song, C. W.; Shin, J. H.; Lee, S. Y. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabolic Engineering* 2015, 28, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.12.007>.
- (33) Chen, C.; Ding, S.; Wang, D.; Li, Z.; Ye, Q. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava to succinic acid by *Escherichia coli* NZN111. *Bioresource Technology* 2014, 163, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.020>.
- (34) TECSON GmbH&Co KG. Ölmarkt und Rohölpreise <https://www.tecson.de/oelweltmarkt.html> (zuletzt abgerufen am 14. August 2019).
- (35) DECHEMA. Biobasierte Chemikalien | chemanager-online.com - Chemie und Life Science <https://www.chemanager-online.com/themen/chemikalien-distribution/biobasierte-chemikalien> (zuletzt abgerufen am 12. August 2019).
- (36) Pateraki, C.; Patsalou, M.; Vlysidis, A.; Kopsahelis, N.; Webb, C.; Koutinas, A. A.; Koutinas, M. *Actinobacillus succinogenes*: advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochemical Engineering Journal* 2016, 112, 285–303. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.005>.
- (37) Bernsteinsäure – mit Biotech zur grünen Plattformchemikalie <https://www.biooekonomie-bw.de/fachbeitrag/aktuell/bernsteinsaure-mit-biotech-zur-gruenen-plattformchemikalie> (zuletzt abgerufen am 23. Oktober 2019).
- (38) Cok, B.; Tsiropoulos, I.; Roes, A. L.; Patel, M. K. Succinic acid production derived from carbohydrates: an energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2014, 8 (1), 16–29. <https://doi.org/10.1002/bbb.1427>.

- (39) McCoy, M. Succinic Acid, once a biobased chemical star, is barely being made. *Chemical & Engineering News* 2019, 97 (12).
- (40) Li, J.; Jiang, M.; Chen, K.; Shang, L.; Wei, P.; Ying, H.; Ye, Q.; Ouyang, P.; Chang, H. Enhanced production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* with reductive carbon source. *Process Biochemistry* 2010, 45 (6), 980–985. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.001>.
- (41) Thuy, N. T. H.; Kongkaew, A.; Flood, A.; Boontawan, A. Fermentation and crystallization of succinic acid from *Actinobacillus succinogenes* ATCC55618 using fresh cassava root as the main substrate. *Bioresource Technology* 2017, 233, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.114>.
- (42) Lee, P. C.; Lee, S. Y.; Hong, S. H.; Chang, H. N. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2003, 26 (1), 63–67. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0341-1>.
- (43) Meynial-Salles, I.; Dorotyn, S.; Soucaille, P. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and Bioengineering* 2008, 99 (1), 129–135. <https://doi.org/10.1002/bit.21521>.
- (44) Chen, X.; Jiang, S.; Li, X.; Pan, L.; Zheng, Z.; Luo, S. Production of succinic acid and lactic acid by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions. *Annals of Microbiology* 2013, 63 (1), 39–44. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0441-8>.
- (45) Guettler, M. V.; Rumler, D.; Jain, M. K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999, 49, 207–216.
- (46) Bradfield, M. F. A.; Nicol, W. Continuous succinic acid production from xylose by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2016, 39 (2), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1507-3>.
- (47) Stellmacher, R.; Hangebrauk, J.; Wittmann, C.; Scholten, E.; Abendroth, G. von. Fermentative Herstellung von Bernsteinsäure mit *Basfia succiniciproducens* DD1 in Serumflaschen. *Chemie Ingenieur Technik* 2010, 82 (8), 1223–1229. <https://doi.org/10.1002/cite.201000094>.
- (48) Vlysidis, A.; Binns, M.; Webb, C.; Theodoropoulos, C. Glycerol utilisation for the production of chemicals: conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical Engineering Journal* 2011, 58–59, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.07.004>.
- (49) Shen, N.; Qin, Y.; Wang, Q.; Liao, S.; Zhu, J.; Zhu, Q.; Mi, H.; Adhikari, B.; Wei, Y.; Huang, R. production of succinic acid from sugarcane molasses supplemented with a mixture of corn steep liquor powder and peanut meal as nitrogen sources by *Actinobacillus succinogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 2015, 60 (6), 544–551. <https://doi.org/10.1111/lam.12399>.
- (50) Schröder, H.; Haefner, S.; Abendroth, G. V.; Hollmann, R.; Raddatz, A.; Ernst, H.; Gurski, H. Novel microbial succinic acid producers and purification of succinic acid. WO2010092155A1, August 19, 2010.

- (51) Gao, C.; Yang, X.; Wang, H.; Rivero, C. P.; Li, C.; Cui, Z.; Qi, Q.; Lin, C. S. K. Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Bio-technology for Biofuels* 2016, 9 (1), 179. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0597-8>.
- (52) Li, C.; Yang, X.; Gao, S.; Wang, H.; Lin, C. S. K. High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 2017, 225, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.016>.
- (53) Yocum, R. R.; Hermann, T.; Hu, X. Fermentation of glycerol to organic acids. US20140234923A1, August 21, 2014.
- (54) Okino, S.; Noburyu, R.; Suda, M.; Jojima, T.; Inui, M.; Yukawa, H. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, 81 (3), 459–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1668-y>.
- (55) Vemuri, G. N.; Eiteman, M. A.; Altman, E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002, 28 (6), 325–332. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000250>.
- (56) Wang, C.; Zhang, H.; Cai, H.; Zhou, Z.; Chen, Y.; Chen, Y.; Ouyang, P. Succinic acid production from corn cob hydrolysates by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014, 172 (1), 340–350. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0539-x>.
- (57) Munk, K.; Dersch, P.; Eikmanns, B.; Eikmanns, M.; Fischer, R. *Mikrobiologie*, 1st ed.; Thieme: Stuttgart New York, 2008.
- (58) Chen, X.; Jiang, S.; Zheng, Z.; Pan, L.; Luo, S. Effects of culture redox potential on succinic acid production by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions. *Process Biochemistry* 2012, 47 (8), 1250–1255. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.026>.
- (59) Herselman, J.; Bradfield, M. F. A.; Vijayan, U.; Nicol, W. The effect of carbon dioxide availability on succinic acid production with biofilms of *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal* 2017, 117, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.018>.
- (60) Zhang, X.; Shanmugam, K. T.; Ingram, L. O. Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2010, 76 (8), 2397–2401. <https://doi.org/10.1128/AEM.02902-09>.
- (61) Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; Wezel, G. P. van. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2016, 80 (1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.
- (62) Neumeister, B.; Geiss, H. K.; Braun, R.; Kimmig, P. *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*, 2., vollständig überarbeitete.; Thieme: Stuttgart New York, 2009.

- (63) Ventura, M.; Canchaya, C.; Tauch, A.; Chandra, G.; Fitzgerald, G. F.; Chater, K. F.; Sinderen, D. van. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007, 71 (3), 495–548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>.
- (64) Stackebrandt, E.; Rainey, F. A.; Ward-Rainey, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1997, 47 (2), 479–491.
- (65) Yassin, A.-A. F. The Family Actinomycetaceae. in *The Prokaryotes: Actinobacteria*; Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; pp 21–103. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_171.
- (66) Palakawong Na Ayudthaya, S.; Pristaš, P.; Hrehová, L.; Javorský, P.; Stams, A. J. M.; Plugge, C. M. *Actinomyces succiniciruminis* sp. nov. and *Actinomyces glycerinitolerans* sp. nov., two novel organic acid-producing bacteria isolated from rumen. *Systematic and Applied Microbiology* 2016, 39 (7), 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.08.001>.
- (67) Palakawong Na Ayudthaya; Hornung, B.; Ravikumar Varadarajan, A.; Plugge, W.; Plugge, C. M. Draft genome sequence of *Actinomyces succiniciruminis* strain Am4(T), isolated from cow rumen fluid. *Genome announcements* 2017, 5 (29), e01587-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01587-16>.
- (68) Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Scheldeman, P.; Kersters, K.; De Vos, P.; Logan, N. A.; Aziz, A. M.; Ali, N.; Berkeley, R. C. W. A Polyphasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1996, 46 (4), 988–1003.
- (69) Wilkens, E. Medienoptimierung zur Kostenreduktion der mikrobiellen Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol, 2012.
- (70) Ringel, A. K. Screening-Strategien für mikrobielle Hochleistungsstämme am Beispiel der 1,3 Propandiol-Produktion aus Rohglycerin, 2012.
- (71) Brewer, J. H. Clear liquid mediums for the aerobic cultivation of anaerobes. *Journal of the American Medical Association* 1940, 115 (8), 598–600. <https://doi.org/10.1001/jama.1940.72810340001009>.
- (72) Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1966, 16 (3), 313–340.
- (73) Xylem Analytics | Gelöstsauerstoff-Bestimmung mit WTW und SI Analytics <https://www.xylemanalytics.com/de/parameter/geloester-sauerstoff> (zuletzt abgerufen am 12. August 2019).
- (74) Lee, P. C.; Lee, W. G.; Lee, S. Y.; Chang, H. N. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. *Process Biochemistry* 1999, 35 (1), 49–55. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00031-X).
- (75) Samuelov, N. S.; Lamed, R.; Lowe, S.; Zeikus, J. G. Influence of CO₂-HCO₃[–] levels and ph on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and Environmental Microbiology* 1991, 57 (10), 3013–3019.

Literatur

- (76) Xi, Y.; Chen, K.; Xu, R.; Zhang, J.; Bai, X.; Jiang, M.; Wei, P.; Chen, J. Effect of biotin and a similar compound on succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a chemically defined medium. *Biochemical Engineering Journal* 2012, 69, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.016>.
- (77) Thünen-Institut: Mikrobiomanalysen - Methodentwicklung und Bioinformatik <https://www.thuenen.de/de/bd/projekte/mikrobiomanalysen-methodentwicklung-und-bioinformatik/> (zuletzt abgerufen am 13. August 2019).

Anhang

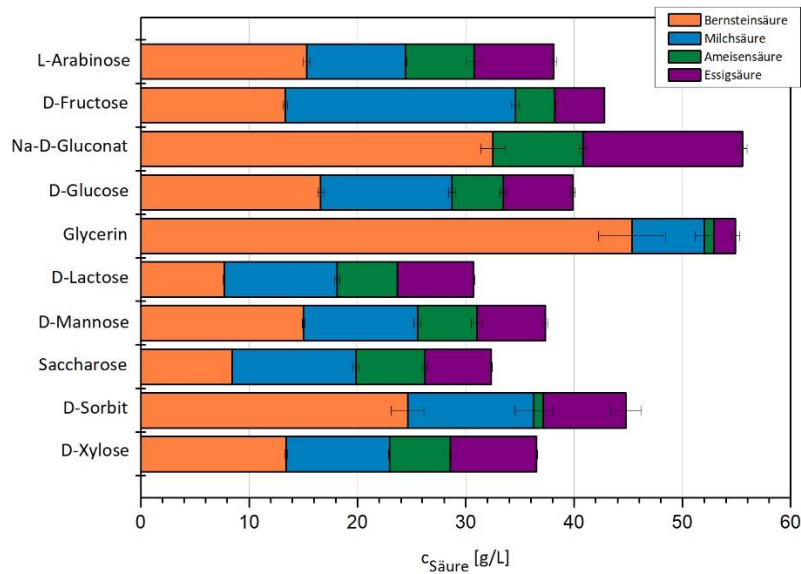


Abbildung 67: Aufsummierung der gebildeten Produkte (Bernstein-, Milch-, Ameisen- und Essigsäure) im Vergleich zum eingesetzten Substrat mit einer Initialkonzentration von 50 g/L, Standardproduktionsmedium mit 50 g/L MgCO_3 , Arbeitsvolumen: 50 mL, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle

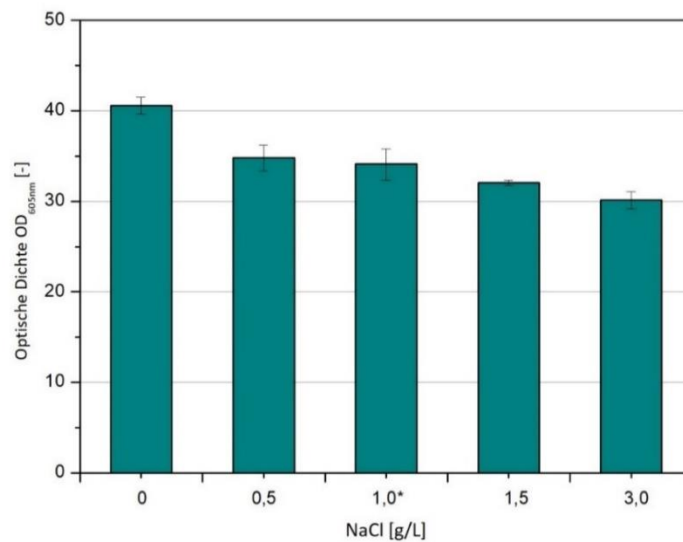


Abbildung 68: Optische Dichte der Mischkultur DSM 32268 bei variierender NaCl-Konzentration von 0 g/L, 0,5 g/L, 1,0 g/L (Standard), 1,5 g/L und 3,0 g/L in Standardproduktionsmedium, Glycerin- und Magnesiumkonzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage

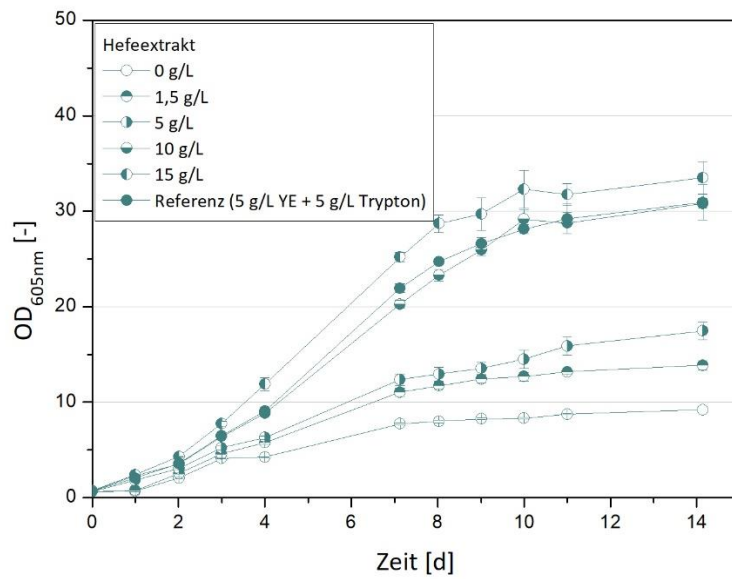


Abbildung 69: Verlauf der Optischen Dichte bei der Mischkultur DSM 32268 bei Variation der Hefeextraktkonzentration, Standardproduktionsmedium, Glycerin- und Magnesiumkonzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T: 32 °C, U: 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage

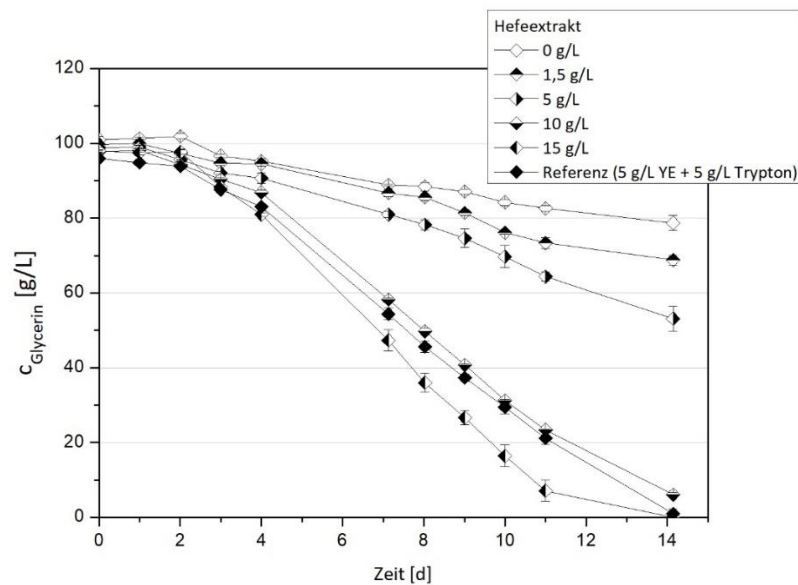


Abbildung 70: Substratverbrauch bei Variation der Hefeextraktkonzentration, Standardproduktionsmedium, Glycerin- und Magnesiumkonzentration: 100 g/L, Arbeitsvolumen: 50 mL, T = 32 °C, U = 150 rpm, 100 mL Laborflasche mit Septum und Kanüle, Kultivierungsdauer: 14 Tage

Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen hätte die vorliegende Studie in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Ulf Prüße, der meine Arbeit stets mit viel Verständnis unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich herzlich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Henning Menzel danke ich für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Für die inhaltliche Ausrichtung und die thematische Eingrenzung sei Frau Dr. Anja Kuenz und Herrn Dr. Thomas Willke gedankt, die meine Arbeit über einen längeren Zeitraum begleitet haben. Durch ihr großes Engagement, fachliche Hinweise und ihr professionelles Lektorat haben sie wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Agrartechnologie des Thünen-Instituts für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Besonders danke ich meinen beiden Bürokolleginnen im BIOBST-Projekt: Frau Dagmar Wenderoth und Frau Dipl.-Ing. Katharina Goy - für die gemeinsame und vertrauensvolle Zusammenarbeit, sowohl für die Unterstützung im Labor als auch für die fachlichen und persönlichen Gespräche.

Der Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nimmt meine Familie ein. Ohne Ihre liebevolle Fürsorge wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, welches sie heute ist. Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Partner, Martin Böttcher, für seine uneingeschränkte Unterstützung, Motivation und seine bedingungslose Liebe.